Série A, n° 956
N° d'Ordre :
981

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

PAR

Madame Malka ROBERT

1re THÈSE. — ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES ASPERGILLOMARASMINES.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 février 1962 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER ... *Président*
J. TONNELAT ... *Examinateurs*
M. PANIGEL ...

Série A, n° 956
N° d'Ordre :
981

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

PAR

Madame Malka ROBERT

1re THÈSE. – ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES ASPERGILLOMARASMINES.

2e THÈSE. PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 février 1962 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER . . . *Président*
J. TONNELAT . } *Examinateurs*
M. PANIGEL . . . }

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE des SCIENCES de L'UNIVERSITE de PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen ..... M. ZAMANSKY

LIA	*Analyse supérieure et Algèbre supérieure*
ROGLIE	*Théories physiques*
ANT	*Anatomie et Histologie comparées*
S	*Mécanique des fluides et applications*
SE	*Evolution des êtres organisés*
OST	*Chimie organique*
DRON	*Chimie appliquée*
T	*Minéralogie et Cristallographie*
SIER	*Zoologie*
ENOT	*Biologie végétale (Orsay)*
R	*Physique quantique et Relativité*
NIER	*Physiologie générale*
TEAU	*Paléontologie*
RD	*Physique (E.N.S.)*
AN	*Mathématiques (E.N.S.)*
ITTE	*Chimie générale*
RD	*Géométrie supérieure*
OMB	*Physique du Globe*
OUSIN	*Biologie animale (S.P.C.N.)*
TIEN	*Chimie minérale*
H	*Zoologie*
LER	*Physique (E.N.S.)*
USSI	*Génétique*
RE	*Géologie (S.P.C.N.) et sedim.*
HERET	*Biologie végétale (P.C.B.)*
S R.	*Recherches physiques*
IAS A.	*Biologie cellulaire*
LF	*Optique appliquée*
ND	*Physique Enseignement*
ILLET	*Physique (P.C.B.)*
IER	*Mécanique expérimentale des fluides*
ON	*Astronomie*
	Biologie maritime
IEY	*Météorologie et Dynamique atmosphérique*
IEN	*Embryologie*
HORN	*Botanique*
UGNAC	*Biologie végétale (S.P.C.N.)*
AUCHOIS	*Chimie Physique*
LIER	*Physique du Globe*
RITIER	*Biologie générale (Orsay)*
ET	*Radioélectricité (Orsay)*
IN	*Mécanique générale*
EIL	*Arithmétique et théorie des nombres*
ET	*Chimie organique*
IARD	*Géophysique appliquée*
MPETIER	*Chimie macromoléculaire*
LLIER	*Micropaléontologie*
	Pétrographie
LAT	*Microscopie et diffraction électronique*
MANN	*Chimie organique et structurale*
UINOT	*Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)*
Y	*Physique de l'Atmosphère*
OUCHES	*Théories physiques*
L	*Chimie générale*
RT	*Minéralogie et Cristallographie*
MATHIEU	*Physique (Optique)*
EAUX	*Biologie animale (P.C.B.)*
	Zoologie (Orsay)
QUET	*Théorie des fonctions et Topologie*
OMANN	*Biologie végétale marine*
IER	*Physique des solides (Orsay)*
	Physiologie comparée
ET	*Calcul des probabilités et Physiques mathématique*
WARTZ	*Calcul différentiel et intégral*
UARD	*Physiologie végétale*
AVARD	*Aviation (Technique aéronautique)*
LOT	*Calcul différentiel et intégral*
MANT	*Synthèse organique générale*
ARD	*Chimie minérale*
AT	*Botanique (E.N.S.)*
UE	*Statistiques mathématiques*
AIRAC	*Psychophysiologie*
CH	*Physiologie végétale*
ÉCHAL	*Optique théorique et appliquée*
RMANN	*Théories chimiques*
DEFAUD	*Botanique*
LE BRETON	*Physiologie de la nutrition*
M	*Mathématiques générales*
ONG	*Application de l'analyse à la Géométrie*
LLERS	*Anatomie et Histologie comparées*
ESMANN	*Topologie algébrique*
ICON	*Physique (S.P.C.N.)*
GEAUD	*Géographie physique et Géologie dynamique*
EMENT	*Mathématiques (M.P.C.)*
T	*Techniques mathématiques de la Physique*
	Géologie
TZMAN	*Astrophysique*
IER	*Paléontologie stratigraphique*
NSKY	*Mathématiques générales*
UIER	*Physique (M.G.P.)*
T	*Génétique (Orsay)*
HIER	*Géologie appliquée*
TONNELAT	*Physique théorique*
IER	*Mathématiques (M.P.C.)*
HAY	*Chimie générale*
AIN	*Electrotechnique générale*
SET	*Chimie systématique*
EVY	*Physique théor. des hautes énergies (Orsay)*
HAIX	*Chimie biologique*
UREL	*Biologie végétale (P.C.B.)*
X	*Chimie (M.P.C.)*

BRUN	*Mécanique expérimentale des fluides*
LEDERER	*Chimie biologique*
Mme DUBREIL	*Mathématiques (Agreg.)*
Mme LELONG	*Mathématiques (E.N.S.)*
BELLAIR	*Géologie (S.P.C.N.)*
COTTE	*Physique Electricité*
DUBOIS J.-E.	*Chimie organique*
LAMOTTE	*Zoologie (E.N.S.)*
MICHEL André	*Chimie minérale (Orsay)*
OLMER	*Energétique générale*
ROUAULT	*Electricité (Orsay)*
GAUTHIER	*Mécanique appliquée*
BARCHEWITZ	*Chimie physique*
BROSSEL	*Physique atomique*
BUSER	*Physiologie comparée*
CAMUS	*Physiologie végétale (B.M.P.V.)*
CASTAING	*Physique (Orsay)*
CURIEN	*Minéralogie et Cristallographie*
MOYSE	*Physiologie végétale (Orsay)*
NOIROT	*Evolution des êtres organiques*
PANNETIER	*Chimie générale (Orsay)*
POSSOMPES	*Zoologie*
PULLMANN	*Chimie théorique*
TEILLAC	*Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay)*
TONNELAT	*Biologie physico-chimique*
VILLE	*Econométrie*
WILLEMART	*Chimie (P.C.B.)*
DODÉ	*Chimie (Orsay)*
FREYMANN	*Recherches Physiques*
GUINOCHET	*Biologie végétale (S.P.C.N.) (ORSAY)*
ROLLET	*Chimie (P.C.B.)*
Mlle JOSIEN	*Chimie (S.P.C.N.)*
CHEVALLEY	*Géométrie algébrique et théorie des groupes*
ARNOULT	*Electronique (Orsay)*
CHAPELLE	*Physique (Orsay)*
DELANGE	*Mathématiques (Orsay)*
DENY	*Mathématiques générales (Orsay)*
GERMAIN	*Mécanique théorique des fluides*
LUCAS G.	*Géologie*
ALLARD	*Chimie physique*
BERTHELOT	*Physique fondam. des hautes énergies (Orsay)*
BRICARD	*Météorologie et physique de l'Atmosphère*
Mme ALBE-FESSARD	*Psychophysiologie*
FRIEDEL	*Physique des solides (Orsay)*
M. JULIA	*Etudes des moléculaires naturelles complexes*
LENDER	*Biologie animale (S.P.C.N.) Orsay*
MAGAT	*Physico-chimie des radio-éléments*
Mlle QUINTIN	*Electrochimie*
MONOD	*Chimie du métabolisme*
BENOIT	*Physiologie animale (Orsay)*
DE POSSEL	*Analyse numérique*
CHARLOT	*Chimie analytique*
HAISSINSKY	*Radiochimie*
LEMÉE	*Physiologie B.M.P.V. (Orsay)*
GUÉRIN	*Chimie M.P.C. (Orsay)*
CHATELET M.	*Chimie (P.C.B.)*
JEAN	*Physique nucléaire (Orsay)*
MATTLER	*Physique S.P.C.N. (Orsay)*
MICHEL Louis	*Physique théorique des hautes énergies (Orsay)*
BERGÉRARD	*Zoologie (Orsay)*
BERTEIN	*Electronique (Orsay)*
BOUISSIÈRES	*Chimie des radioéléments (Orsay)*
Mme COUTURE	*Thermodynamique et Mécanique physique*
ELLENBERGER	*Géologie appliquée sur le terrain*
FRANC	*Biologie animale (P.C.B.)*
SCHNELL	*Botanique tropicale (Orsay)*
STOLKOWSKI	*Physiologie générale*
ACHER	*Chimie biologique (Orsay)*
BAUDOIN	*Biologie*
BEAUMONT	*Biologie animale S.P.C.N.*
BLAMONT	*Géophysique Ionosphère*
BOURREAU	*Biologie végétale (S.P.C.N.) Orsay*
CURIE D.	*Physique (M.G.P.)*
DURAND-DELGA	*Géologie*
FRÉON	*Chimie organique (Orsay)*
HELLER	*Physiologie végétale*
TORTRAT	*Calcul des probabilités*
CAILLEUX	*Géologie (S.P.C.N.)*
MAGNAN	*Physique (S.P.C.N.)*
DAUDEL	*Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire*
Mlle FOURCROY	*Biologie végétale (S.P.C.N.)*
Mme FOURÈS-BRUHAT	*Mécanique analytique et Mécanique céleste*
Mlle VEIL	*Physiologie générale*
LWOFF	*Microbiologie*
SIESTRUNCK	*Mécanique physique et expérimentale*
LACOMBE	*Métallurgie des métaux nucléaires*
BROCHARD	*Physique P.C.B. (Orsay)*
CABANNES	*Mécanique générale*
LESIEUR	*Mathématiques M.P.C. (Orsay)*
MAZET	*Mécanique générale (Orsay)*
CAIRE	*Géographie phys. et Géologie dynamique*
COMOLET	*Mécanique des fluides*
CORABOEUF	*Physiologie animale*
DELLOUE	*Physique de l'exosphère*
GORENFLOT	*Botanique II (Orsay)*
HOUILLON	*Biologie animale (P.C.B.)*
JULLIEN J.	*Chimie (P.C.B.)*
MALGRANGE	*Techniques Mathématique de la Phys.*
OLIVIER	*Antropologie*
NOZERAN	*Botanique II (Orsay)*
BLANC-LAPIERRE	*Physique ENS. (Orsay)*

Secrétaire général ..... R. POULLAIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538126_0037

A mes Parents

La partie chimique de ce travail a été effectuée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, sous la direction de Monsieur le Professeur E. Lederer. Je suis heureuse de lui exprimer ici ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie dans l'Institut, pour l'intérêt constant avec lequel il a suivi mon travail, pour les conseils qu'il m'a prodigués et pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de mon jury.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Monsieur M. Barbier, Chargé de Recherches au C.N.R.S., qui a dirigé mes travaux de chimie organique, tant pour le vif intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, que pour ses encouragements qui ne m'ont jamais fait défaut.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur M. F. Jayle qui m'a accueillie dans son service à la Faculté de Médecine durant la première période de mon travail, ainsi qu'à Monsieur le Professeur J. Polonovski et à Monsieur P. Rebeyrotte pour les conseils qu'ils m'ont prodigués.

J'exprime ma gratitide à mon frère, Monsieur L. Robert, Chargé de Recherches au C.N.R.S., qui m'a guidée pendant l'exécution de la partie biochimique de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à la Société d'Etudes et d'Applications Biochimiques dont le soutien matériel a rendu possible l'exécution de cette thèse, à Monsieur P. Lalanne, gérant de la Société et à Monsieur P. Roux, son principal collaborateur, pour ses précieux conseils.

Je remercie Messieurs les Professeurs J. Tonnelat et M. Panigel qui ont bien voulu me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur K. Biemann, le Dr. W. Vetter du Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (U.S.A.), Monsieur le Professeur E. Stenhagen, de l'Université de Goteborg (Suède) et Monsieur J. Nekhorocheff pour avoir bien voulu accepter d'effectuer et d'interpréter les spectres de masse.

Les dosages des acides aminés et les électrophorèses à haut voltage mentionnés dans ce travail ont été effectués au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Paris, au laboratoire de Monsieur P. Jollès, Maître de Recherches au C.N.R.S. Je lui adresse mes remerciements ainsi qu'à ses collaborateurs.

Je remercie Monsieur le Professeur E. Hardegger et Madame S. Naef-Roth de l'Ecole Polytechnique de Zurich, qui ont bien voulu nous envoyer des échantillons de lycomarasmine et de substance J, et pour les essais biologiques des aspergillomarasmines.

Je tiens à remercier Messieurs D. Mercier et E. Tchakotine pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la présentation de ce travail.

Je remercie très vivement tous mes camarades de laboratoire à la Faculté de Médecine et à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles pour l'aide amicale qu'ils m'ont toujours apportée.

o o o

TABLE DES MATIERES

PARTIE CHIMIQUE

CHAPITRE I INTRODUCTION .. .. page 5

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE II ETUDE CHIMIQUE DES ASPERGILLOMARASMINES
1. Aspergillomarasmine A.. .. .. .. " 10
2. Aspergillomarasmine B.. .. .. .. " 12
3. Anhydro-aspergillomarasmine B.. .. " 15
4. Discussion des résultats .. .. .. " 17

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES " 20

CHAPITRE IV ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ASPERGILLOMARASMINE B.. .. .. " 24

CHAPITRE V ASPERGILLOMARASMINE A .. .. .. " 27

CHAPITRE VI ASPERGILLOMARASMINE B .. .. .. " 31

CHAPITRE VII ANHYDRO-ASPERGILLOMARASMINE B " 46

CHAPITRE VIII SYNTHESE DU MALONOYL NN' BISGLYCINE " 52

PARTIE BIOLOGIQUE

CHAPITRE IX ASPERGILLOMARASMINES ET LYCOMARASMINES .. .. " 57

CHAPITRE X EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LES REACTIONS CATALYSEES PAR LE Cu^{++} .. .. page 66

CHAPITRE XI EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LA FORMATION DES PEROXYDES LIPIDIQUES DANS DES HOMOGENATS DE FOIE.. .. .. " 88

CHAPITRE XII ACTION ANTI-PEROXYDASIQUE DE L'ASPERGILLOMARASMINE B DANS LES REACTIONS CATALYSEES PAR L'HEMOGLOBINE ET PAR LE COMPLEXE HEMOGLOBINE-HAPTOGLOBINE .. .. .. " 100

CHAPITRE XIII INFLUENCE DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES CHEZ ESCHERICHIA COLI B .. .. " 115

CHAPITRE XIV EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LA FORMATION DU GRANULOME EXPERIMENTAL PROVOQUE PAR LA CARRAGEENINE CHEZ LES COBAYES .. " 126

RESUME .. .. " 135

BIBLIOGRAPHIE .. .. " 141

DEUXIEME THESE.

======

PARTIE CHIMIQUE

CHAPITRE I

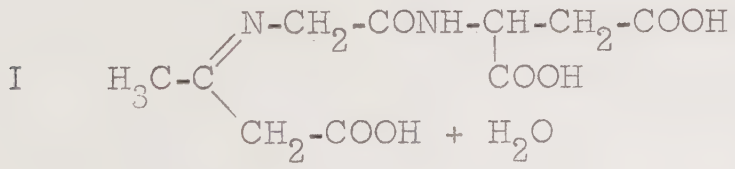
INTRODUCTION

En 1956-1957 les laboratoires de la Société d'Etudes et d'Applications Biochimiques ont entrepris l'examen de trois substances produites par une souche du champignon Aspergillus flavus oryzae (ordre des Ascomycètes).

Ces substances, d'abord appelées "Aspergillopeptides" A, B et C, ont été obtenues après passage du milieu de culture synthétique sur des échangeurs de cations. Une fois purifiées, elles se présentent sous forme de poudres blanches cristallines.

La substance B étant douée de diverses propriétés biologiques et physicochimiques intéressantes, et se trouvant en quantité plus importante dans les milieux de culture, nous avons orienté nos recherches plus particulièrement vers cette substance.

L'hydrolyse de la substance B donne du glycocolle, de l'acide aspartique et des traces d'acide acétoacétique (2,4-dinitrophénylhydrazone). En conséquence, dès le début de ce travail, les chercheurs de la S.E.A.B. ont proposé la structure I.



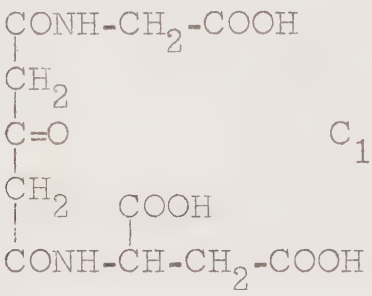
I $H_3C-C(=N-CH_2-CONH-CH(COOH)-CH_2-COOH)-CH_2-COOH + H_2O$ $\quad C_{10}H_{14}O_7N_2 + H_2O$

P.M.: 274+18

Cette structure a été abandonnée, car elle ne rendait pas compte de l'absence de C-CH_3 dans la molécule, ni des résultats de l'analyse élémentaire.

Après l'étude au spectrographe de masse, de l'ester méthylique de la substance B, préparé par action du diazométhane en excès, et détermination de la masse moléculaire de 360 pour cet ester, une seconde formule (II) fut avancée :

II



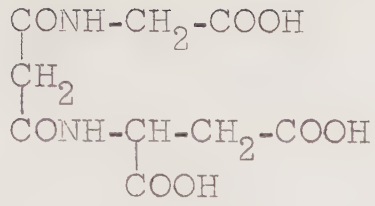
$C_{11}H_{14}O_9N_2$ P.M. : 318

Cette structure permettait d'expliquer la formation par hydrolyse, d'acide acétoacétique et d'acétone, et la libération équimoléculaire à même vitesse des deux acides aminés.

Lorsqu'il fut prouvé que la masse 360 provenait d'une réaction secondaire, cette seconde hypothèse dut être abandonnée; les analyses ont montré en effet que le diazométhane avait introduit des groupements méthyle sur l'azote (% N-CH_3 avant méthylation : 1,08 - 1,11 %; après méthylation : 18,61 - 19,12 %).

La détermination de l'équivalent moléculaire par titrage acidimétrique, les titrages complexométriques faits à la S.E.A.B. et les résultats des analyses élémentaires, nous ont ensuite suggéré une masse moléculaire pour la substance B, comprise entre 270 et 280. Nous avons alors envisagé une troisième hypothèse, celle d'un acide maloncyl NN' glycine aspartique (III), et pensé que l'acétone, trouvé en faible quantité, pouvait provenir de l'hydrolyse d'une impureté.

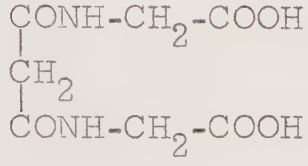
III



$C_9H_{12}O_8N_2$ P.M.: 276

Nous avons alors entrepris la synthèse d'un corps analogue, le malonoyl NN' bisglycine (IV).

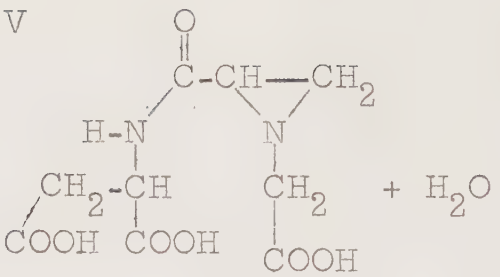
IV



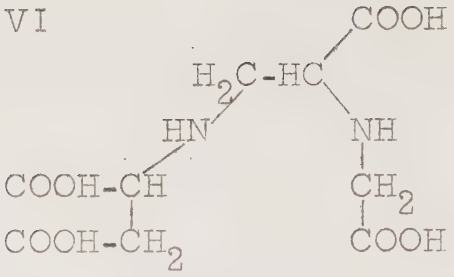
$C_7H_{10}O_6N_2$ P.M.: 218

Après examen de ce produit nous avons été obligés d'abandonner l'hypothèse d'une diamide car la substance synthétique donnait une réaction biuret positive, tandis que la substance B donne une réaction biuret négative. D'autre part les résultats des titrages complexométriques ont montré que cette substance est un chélateur faible, du même ordre de grandeur que le glycocolle, - il n'y avait donc pas lieu de penser que les deux corps fussent analogues.

La spectrographie de masse, réalisée sur les esters méthyliques et éthyliques préparés selon la technique de Biemann (1) par le méthanol et l'éthanol chlorhydriques, ont conduit à la masse de 302 pour l'ester méthylique et de 344 pour l'ester éthylique. Biemann, se basant sur les résultats des spectres de masse, a proposé comme hypothèse de travail pour la substance B la formule V, puis la formule VI. Nous discuterons en détail au chapitre II la valeur de ces différentes hypothèses.

V 

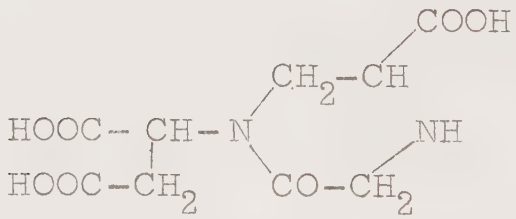
$C_9H_{12}O_7N_2$ P.M.: 260 + 18

VI 

$C_9H_{14}O_8N_2$ P.M.: 278

En ce qui concerne la substance A ($C_{10}H_{17}O_8N_3$ ou $C_9H_{15}O_7N_3$), les résultats des essais effectués jusqu'à présent ne permettent pas de proposer une formule développée.

Nous avons pu montrer que la substance C provient de la substance B par lactamisation. Les résultats de la spectrographie de masse selon l'interprétation de Biemann nous ont suggéré pour ce produit la formule VII :

VII  $C_9H_{12}O_7N_2$ P.M.: 260

Au cours de nos recherches sur la structure de ces substances, nous avons trouvé une analogie étroite entre les "aspergillopeptides" et la lycomarasmine et ses dérivés. La lycomarasmine est une phytotoxine isolée par Plattner et coll. du milieu de culture d'un champignon phytopathogène, le Fusarium lycopersici (Sacc.) (2, 3).

La substance B s'est révélée être une phytotoxine très forte. Elle est identique à l'acide lycomarasmique, obtenu par Liechti (4) à partir de la lycomarasmine. Nous avons pu établir également l'identité de notre substance C et de la substance J,

isolée du même milieu de culture que la lycomarasmine. La substance A, qui s'est révélée être, elle aussi, une phytotoxine, et la lycomarasmine, malgré certaines analogies, ne sont pas identiques. Ces résultats ressortent de l'examen des constantes physiques, de la comparaison des spectres I.R. et des activités flétrissantes sur les feuilles de tomates (voir tableau I et chapitre IX).

A la suite de ces résultats, nous avons remplacé les appellations "aspergillopeptides" par celles d'aspergillomarasmines A et B et d'anhydro-aspergillomarasmine B. Ces appellations sont en effet en accord avec les propositions de nomenclature des phytotoxines selon Gäumann (5). Nous avons également entrepris une étude biochimique sur la substance B. Nous avons étudié son action antioxydante et montré que cette substance inhibe l'oxydation de l'acide ascorbique, des fonctions thiol de la cystéine, de la sérumalbumine et de la caséine en présence du cuivre comme catalyseur.

Nous avons constaté que l'aspergillomarasmine B possède une activité anti-peroxydasique en utilisant l'hémoglobine ou le complexe hémoglobine-haptoglobine comme catalyseur et qu'elle inhibe la formation des peroxydes lipidiques, provoqués par des rayons U.V. d'une part et par action de l'acide ascorbique d'autre part, dans des homogénats hépatiques du cobaye.

Nous avons étudié l'effet de l'aspergillomarasmine B sur le métabolisme des acides nucléiques chez Escherichia coli B et finalement, son action sur la formation des granulomes provoqués par l'injection sous-cutanée de la carragénine aux cobayes.

Les résultats de ces études seront exposés dans cette thèse.

o o o

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE II

ETUDE CHIMIQUE DES ASPERGILLOMARASMINES

1. Aspergillomarasmine A.

La substance A se trouve dans les cultures jeunes d'Aspergillus flavus oryzae. Elle apparaît dès que le pH de la culture atteint 4,5 et continue à se former tant que le pH reste inférieur à 7. Une fois purifiée, elle se présente sous forme d'une poudre blanche, cristalline. Les cristaux ont la forme de petits grains, ils commencent à se décomposer à 225° et à 236° la décomposition est totale. Le produit est insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Il est soluble dans l'acide chlorhydrique à partir d'une concentration 2 N et dans les alcalis dilués à partir de pH 7. Le pouvoir rotatoire mesuré dans un tampon phosphate à pH 7 est : $[\alpha]_D^{20°}$: -48° (concentration 1%). Les courbes de titrages acidimétriques indiquent deux carboxyles forts, avec des pK 3,5 et 4,5. On observe deux fonctions aminées de pK 9,5 et 10. Par la méthode de Sörensen on trouve une valence aminée libre sur trois, mais la méthode de Van Slyke indique deux fonctions aminées libres. Selon les titrages complexométriques, 1 micromole de métal est chélatée par un poids de substance A voisin de 310 µg.

Les analyses élémentaires effectuées sur cette substance

nous conduisent à envisager deux possibilités pour la formule brute de l'aspergillomarasmine A : $C_9H_{15}O_7N_3$ ou $C_{10}H_{17}O_8N_3$. La substance ne possède pas de groupement C-CH_3, ni O-CH_3, ni N-CH_3.

Le spectre d'absorption infrarouge, mesuré dans le nujol (fig. 1, p.29), ne révèle pas de liaison CONH, ni l'existence des bandes OH. Nous avons essayé de mesurer à cet effet les spectres I.R. des sels de sodium (dans ces conditions, la bande CO des carboxyles est déplacée et laisse apparaître la bande due au CO de CONH). Malheureusement les sels de sodium des aspergillomarasmines dans le nujol n'ont pas fourni de spectre convenable.

Le test à l'hypoiodite de sodium et la réaction du biuret donnent des résultats négatifs avec l'aspergillomarasmine A. On peut donc exclure la présence de deux fonctions CONH et des fonctions méthyl-cétone dans la molécule. La substance réagit à la ninhydrine en donnant une coloration pourpre, à froid. Lors de chromatographies sur papier dans le système n°IV, le R_F de l'aspergillomarasmine A est de 0,10.

L'hydrolyse chlorhydrique (4 heures dans HCl 6 N à 120°) de l'aspergillomarasmine A libère deux substances révélables à la ninhydrine. L'une possède, à la chromatographie sur papier dans le système n°1, un R_F de 0,15, identique à celui de l'acide aspartique. L'autre possède un R_F de 0,04 et ne semble pas correspondre à un acide aminé connu. Nous avons isolé cette substance par chromatographie préparative sur papier. Après élution du papier nous avons obtenu une substance amorphe, incristallisable et très hygroscopique. Nous n'avons pas réussi à en obtenir un chlorhydrate ou un picrate cristallisés. Le comportement de cette substance lors d'un essai d'électrophorèse sur

papier (2 heures à pH 6,5, 750v, tampon pyridine-acide acétique) révèle un comportement acide, la substance migrant dans ces conditions exactement comme l'acide cystéique. Les aspergillomarasmines ne contenant pas de soufre, l'identité avec l'acide cyctéique a été rejetée; nous avons appelé cette substance "Acide A" (voir fig.2, p.29). Les résultats des essais effectués avec l'aspergillomarasmine A ne nous permettent pas de proposer de formule développée.

2. Aspergillomarasmine B.

L'aspergillomarasmine B apparaît dans les milieux de culture du champignon après l'aspergillomarasmine A, mais continue à se former quand le pH du milieu a atteint 7, bien qu'à ce stade on ne puisse plus démontrer la présence de l'aspergillomarasmine A dans les milieux de culture.

Après purification, la substance B se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline. Les cristaux commencent à se décomposer à 221° et à 231° leur décomposition est complète. L'aspergillomarasmine B est insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Il est soluble dans l'acide chlorhydrique à partir d'une concentration 2 N et dans les alcalis à partir de pH 7. Le pouvoir rotatoire mesuré dans un tampon phosphate à pH 7 est : $[\alpha]_D^{20°} = -20°$ (concentration : 1%).

L'aspergillomarasmine B à l'état solide et en solution à pH alcalin est stable à la température ambiante. Elle se décompose cependant à pH inférieur à 2,6 et elle se transforme en anhydro-aspergillomarasmine B.

La courbe de titrage potentiométrique indique 4 valences, de pK 2,5 , 3,5 , 6,6 et 10,2. L'équivalent moléculaire calculé

d'après le pK de 6,6 se situe entre 275-280. La masse moléculaire de l'aspergillomarasmine B selon la formule VI serait de 278. On ne trouve pas de valence aminée libre par la méthode de Van Slyke. Les résultats des analyses élémentaires et des titrages complexométriques ont permis d'avancer la formule brute $C_9H_{14}O_8N_2$ pour la substance B. Les dosages de $C\text{-}CH_3$, $O\text{-}CH_3$ et $N\text{-}CH_3$ ont toujours été négatifs pour les trois substances et ils ne contiennent ni soufre, ni phosphore, ni halogène.

L'aspergillomarasmine B ne possède pas d'absorption caractéristique dans l'ultraviolet. En ce qui concerne son spectre infrarouge mesuré en suspension dans le nujol, nous n'avons pu mettre en évidence ni les bandes CONH des liaisons peptidiques, ni les bandes OH qui auraient pu confirmer l'existence d'une molécule d'eau de cristallisation, envisagée pour la formule V (voir fig. 3, p. 32).

Les réactions du biuret et à l'hypoiodite de sodium sont négatives avec l'aspergillomarasmine B, et ce fait exclut deux liaisons peptidiques, ainsi que la présence d'un groupement méthyl-cétone dans la molécule.

A froid, l'aspergillomarasmine B ne réagit pas à la ninhydrine, mais si l'on prolonge le chauffage du tube contenant le mélange ou si l'on chauffe le bain-marie à 100°, on obtient une coloration pourpre. Lors de chromatographies sur papier dans le système n°V, le R_F de l'aspergillomarasmine B est de 0,16. L'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B conduit à l'anhydro-aspergillomarasmine B, et ensuite à l'acide aspartique et au glycocolle. L'étude plus approfondie de la cinétique de cette hydrolyse nous a montré que ces deux acides aminés étaient libérés en même temps et en quantité équimoléculaire (voir fig. 4, p. 32). Nous avons isolé par chromatographie sur colonne d'Amberlite

IR 45 A.G. l'acide aspartique de l'aspergillomarasmine B, et montré qu'il s'agissait de l'acide L-aspartique.

L'analyse élémentaire de l'ester méthylique préparé par action du diazométhane (dans l'éther déperoxydé) sur l'aspergillomarasmine B, correspond à la formule brute $C_{13}H_{22}O_8N_2$. Le dosage de O-(CH_3) effectué sur ce même ester indique la présence de quatre fonctions ester dans la molécule.

Nous avons préparé des esters méthyliques par action de quantités insuffisantes de diazométhane sur l'aspergillomarasmine B (méthylation incomplète, mais suffisante pour solubiliser la substance dans les solvants organiques). L'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B préparé de cette manière montre dans l'ultraviolet une bande d'absorption à 190 mμ, $\varepsilon = 1900$, ce qui indique probablement la présence d'une faible quantité d'anhydro-aspergillomarasmine B dans l'aspergillomarasmine B (ce dernier possède une forte bande d'absorption à 190 mμ, $\varepsilon = 10\,000$).

Le spectre de résonance magnétique nucléaire de ce même ester montre la présence d'un système AB_2 entre 40 et 80 cps à partir du tétraméthylsilane (TMS) (voir fig. 8, p. 44). Les spectres de trois différentes éthylène-imines fournies par M. Fétizon, examinées par comparaison, montrent des bandes entre 40 et 110 cps du TMS également.

Le spectre infrarouge des esters méthyliques, préparés par action du sulfate de méthyle sur l'aspergillomarasmine B, présente des bandes d'absorption à 3020 et à 3037 cm^{-1}, qui pourraient être caractéristiques d'un cycle aziridine (6, 7) (voir fig. 9, p. 45).

La spectrographie de masse de l'ester méthylique préparé par action du méthanol chlorhydrique sur l'aspergillomaras -

mine B conduit à la masse de 302. L'ester éthylique préparé dans les mêmes conditions conduit à la masse de 344. Ces résultats étant en accord avec la masse moléculaire calculée pour les esters méthylique et éthylique de l'anhydro-aspergillomarasmine B, on peut penser que l'aspergillomarasmine B se transforme en anhydro-aspergillomarasmine B durant l'estérification.

3. Anhydro-aspergillomarasmine B.

Cette substance apparaît dans les vieilles cultures d'Aspergillus flavus oryzae, quand le pH de la culture est environ à 8 - 9. Après purification, l'anhydro-aspergillomarasmine B se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline. Les cristaux sont en forme de grains un peu plus grands que ceux de l'aspergillomarasmine B. Ces cristaux commencent à se décomposer à 270°, et à 292° la décomposition est complète.

L'anhydro-aspergillomarasmine B, comme les deux autres substances, est insoluble dans les solvants organiques et dans l'eau. Elle se dissout facilement dans une solution aqueuse, amenée à pH 7 à l'aide d'une solution de NaOH 0,01 N; ou bien dans l'acide chlorhydrique à partir d'une concentration 2 N (sans chauffer). Son pouvoir rotatoire, mesuré dans un tampon phosphate à pH 7, est $[\alpha]_D^{20°} = -103°$ (concentration: 1%). Selon les courbes de titrage potentiométriques on calcule un poids moléculaire de 260 environ pour l'anhydro-aspergillomarasmine B. Les pK obtenus avec cette substance sont à 3,7, à 4,5 et à 6,85. L'anhydro-aspergillomarasmine B n'est pas un chélateur fort, son pouvoir complexant est comparable à celui des peptides ordinaires. On ne trouve pas d'azote aminé libre par la méthode de Van Slyke. Selon les résultats des analyses

élémentaires, des titrages acidimétriques et complexométriques, cette substance a la formule brute $C_9H_{12}O_7N_2$ qui correspond à un poids moléculaire de 260.

Le spectre infrarouge de la substance, mesuré dans le nujol, ne révèle pas la liaison peptidique (voir les mêmes remarques que pour les aspergillomarasmines A et B)(fig. 10, p.48). Les tests du biuret et à l'hypoiodite de sodium sont négatifs avec cette substance, comme pour les deux autres aspergillomarasmines. L'anhydro-aspergillomarasmine B donne une coloration jaune avec la ninhydrine. Lors de chromatographies sur papier dans le système n°IV, l'anhydro-aspergillomarasmine B donne une tache avec un R_F de 0,28.

L'hydrolyse acide de cette substance (dans l'acide chlorhydrique 6N à 110° en tubes scellés) libère des quantités équimoléculaires d'acide aspartique et de glycocolle.

L'analyse élémentaire de l'ester méthylique, préparé par action de diazométhane dans l'éther déperoxydé sur l'anhydro-aspergillomarasmine B, correspond à la formule brute $C_{12}H_{18}O_7N_2$, les dosages de O-(CH_3) indiquent la présence de trois fonctions ester dans la molécule. L'ester méthylique préparé par action de quantités insuffisantes de diazométhane sur l'anhydro-aspergillomarasmine B, comme décrit pour l'aspergillomarasmine B, montre la présence d'une bande d'absorption à 190 mμ, ε = 10 000 dans l'ultraviolet.

La spectrographie de masse effectuée avec les esters éthyliques et méthyliques (préparés par action de l'éthanol et du méthanol chlorhydriques) selon l'interprétation du Professeur K. Biemann, donne un spectre identique à celui de l'aspergillomarasmine B (voir schéma de dégradation, p.50). Comme nous

l'avons déjà remarqué, l'aspergillomarasmine B se transforme en anhydro-aspergillomarasmine B au cours de la méthylation.

Nous avons obtenu l'anhydro-aspergillomarasmine B à partir de l'aspergillomarasmine B en milieu acide (pK < 1 à 60°) et par chauffage dans l'eau (95°). En milieu alcalin, la lactamisation de l'aspergillomarasmine B est beaucoup plus difficile, et nous avons obtenu seulement une transformation partielle de la substance B en anhydro-aspergillomarasmine B.

4. Discussion des résultats.

Les résultats des analyses élémentaires, des titrages potentiométriques et complexométriques ont permis d'établir pour les aspergillomarasmines A et B et pour l'anhydro-aspergillomarasmine B les formules brutes : $C_9H_{15}O_7N_3$ ou $C_{10}H_{17}O_8N_3$; $C_9H_{14}O_8N_2$ et $C_9H_{12}O_7N_2$ respectivement.

L'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B et de l'anhydro-aspergillomarasmine B libère en même temps des quantités équimoléculaires d'acide aspartique et de glycocolle.

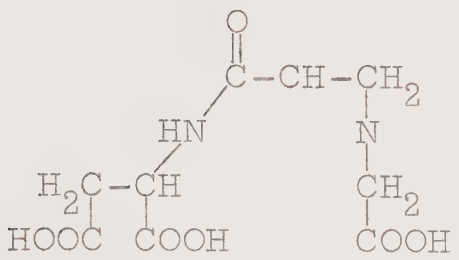
Les dosages de méthoxyle effectués sur les esters ont montré la présence de quatre $COOCH_3$ dans l'aspergillomarasmine B et de trois dans l'anhydro-aspergillomarasmine B.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les structures VI et VII proposées par Biemann pour l'aspergillomarasmine B et pour l'anhydro-aspergillomarasmine B, après étude au spectrographe de masse. La structure V pour l'aspergillomarasmine B, proposée également par Biemann, ne justifie pas la présence de quatre groupements carboxyliques dans la molécule. Elle repose uniquement sur l'existence de signaux particuliers dans les spectres I.R. et NMR, attribués jusqu'alors à un cycle

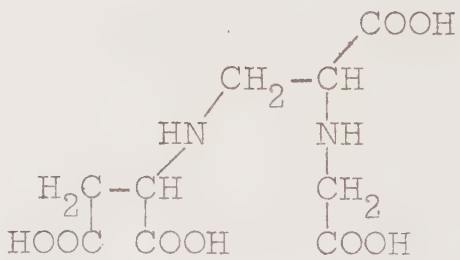
aziridine. Il se pourrait que ces signaux ne soient pas spécifiques de la présence de ce cycle. De plus, l'analyse élémentaire d'un tel composé différerait d'une molécule d'H_2O de l'analyse élémentaire effectivement obtenue. Cette molécule d'eau n'a jamais pu être mise en évidence, en particulier par spectrographie I.R.

Le très fort pouvoir chélateur de l'aspergillomarasmine B est explicable avec les deux formules V et VI. On peut remarquer l'analogie structurale entre ces formules et l'acide éthylène diamine tétraacétique (versène, EDTA) qui est un agent complexant très fort.

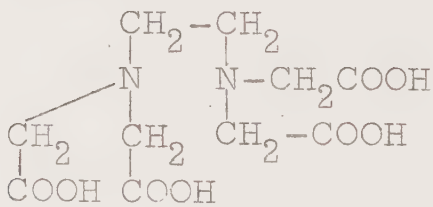
formule V



formule VI



EDTA



L'hypothèse de structure n°VII proposée par Biemann pour l'anhydro-aspergillomarasmine B est en accord avec la structure proposée par Liechti pour la substance J isolée de Fusarium lycopersici (4). Cette structure se trouve étayée par l'existence dans le spectre U.V. de son ester méthylique d'une

absorption à 190 mμ (ε = 10.000) absente dans le spectre U.V. de l'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B. En effet, les amides possèdent un tel maximum (8), et nous avons pu constater qu'il en est ainsi en mesurant le spectre du pyrrolidone carboxylate de méthyle. De plus, la différence d'une molécule d'eau entre les formules brutes de l'aspergillomarasmine B et l'anhydro-aspergillomarasmine B, correspond bien à la formation de l'amide.

Les résultats des essais effectués avec l'aspergillomarasmine A ne nous permettent pas de proposer de formule développée. L'hydrolyse chlorhydrique de l'aspergillomarasmine A libère deux substances révélables à la ninhydrine. L'une est identique à l'acide aspartique, l'autre, que nous avons isolée, ne semble pas être identique à un acide aminé connu.

o o o

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES

1. Techniques analytiques diverses.

Les microdosages de C, H, N, S, C-méthyle, N-méthyle, méthoxyle, ont été effectués par le Service Central de Microanalyse du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette (directeur: M. R. Lévy), par les laboratoires de la Ciba à Bâle (directeur: Dr. Gysel) et par les laboratoires des établissements Firmenich et Cie à Genève (directeur: Dr. Stoll). Un dosage d'oxygène a été effectué au laboratoire de microanalyse de l'Institut Français du Caoutchouc.

Les spectres infrarouges (suspensions dans le nujol) ont été mesurés, sur un appareil Unicam S. P. 100 avec un prisme en chlorure de sodium, par Mme Houelle et M. Hespel au laboratoire de spectrographie infrarouge de la Faculté de Pharmacie de Paris (directeur: Professeur Guy).

Les spectres infrarouges des esters méthyliques ont été mesurés au laboratoire se spectrographie infrarouge de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette par M. Chabaud sur un appareil Unicam S. P. 100, région des 3 000 cm^{-1}, prisme en chlorure de sodium et réseau de 1 200 raies par cm.

Les spectres ultraviolets des esters méthyliques ont été

mesurés sur un appareil Unicam S.P.700, lampe à hydrogène, commençant à 186mμ, dans l'hexane.

Les spectres ultraviolets des 2,4-dinitrophénylhydrazones ont été mesurés avec un appareil de Jobin et Yvon.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés en lumière monochromatique du sodium (raie D) sur un appareil Hilger, dans un tube de 1 dm de longueur.

Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil de Kofler.

Les spectres de masse ont été effectués en partie à Stockholm, dans le laboratoire du Professeur Stenhagen par M. Nekhorocheff, et en partie à Cambridge (U.S.A.), au Massachusetts Institute of Technology, dans le laboratoire du Professeur K.Biemann, par le Dr. W.Vetter.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (NMR) ont été obtenus à Orsay, au laboratoire du Professeur Grivet par M. P.Laszlo, avec un appareil Varian V.3400B, 60 mégacycles.

Les titrages potentiométriques et complexométriques ont été effectués par M. L.Roux au laboratoire de la S.E.A.B.

2. Chromatographie sur papier (9,10).

La chromatographie sur papier (méthodes ascendante, descendante ou circulaire) nous a permis de vérifier l'homogénéité de nos produits et d'identifier les acides aminés dans les hydrolysats ou les dérivés.

Nous avons également étudié par cette technique la cinétique de l'hydrolyse de l'aspergillomarasmine B et vérifié la

composition des produits que nous avons synthétisés.

Comme support nous avons utilisé les papiers Whatman n°1 et 3. Pour les acides aminés nous avons utilisé les systèmes suivants :

N°	Solvant	Proportions v/v
I	butanol-acide acétique-eau	4 : 1 : 5
II	butanol tertiaire-acide formique-eau	69,5 : 1 : 29,5
III	butanol-pyridine-acide chlorhydrique 0,1 N	5 : 3 : 2
IV	pyridine-acide acétique-eau	10 : 7 : 3
V	phénol-eau	8 : 2
VI	phénol à pH 10 (pH ajusté à l'aide d'un tampon borate)	

Les acides aminés ont été révélés par une solution de ninhydrine à 0,2% dans le butanol (11).

Les 2,4-dinitrophénylhydrazones ont été séparées par chromatographie sur papier imprégné de diméthyl formamide et développés par la décaline saturée de la phase stationnaire (12). Nous avons également utilisé pour les 2,4-dinitrophénylhydrazones le système butanol-éthanol-eau (5:1:4).

Les acides gras volatils ont été chromatographiés sur papier sous forme de sels d'éthylamine par la méthode circulaire (13), dans le système eau saturée de butanol (14) et ils ont été révélés par le vert du bromocrésol.

3. Réactions diverses.

a) Réaction du biuret (15).

Le réactif est constitué par un mélange de sulfate de

cuivre avec du tartrate double de sodium et de potassium dans la soude à 10%.

La réaction est positive si la substance examinée contient des groupements $CONH_2$, $C(NH)NH_2$ ou $CSNNH_2$; les peptides donnent une réaction positive seulement s'ils contiennent au moins deux liaisons peptidiques.

La coloration violette est due à la formation d'un complexe de coordination entre les ions de Cu^{++} du réactif, les électrons libres de l'azote et les oxygènes de l'eau.

b) Réaction à la ninhydrine (16).

La méthode consiste à ajouter à la substance à tester en solution dans l'eau, (pH 5-7), 1 ml de réactif (hydrate de tricétohydrindène, en solution à 0,2%, dans le butanol contenant 5% d'acide acétique 2 N). Ensuite on chauffe 5 minutes au bain-marie à 90°. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration pourpre.

c) Test à l'hypoiodite de sodium (17).

On dissout quelques milligrammes de substance dans environ 0,5 ml de NaOH 2 N. Ensuite on ajoute quelques gouttes d'hypoiodite de sodium, fraîchement préparé, en dissolvant 2 - 3 cristaux d'iode dans 1 ml de NaOH 2 N.

Les substances contenant des groupements CH_3CO ou CH_3CO, ou celles susceptibles de s'oxyder en méthylcétone dans les conditions expérimentales, donnent une réaction positive, c'est-à-dire qu'il y a formation d'iodoforme.

$$RCOCH_3 + 3\,NaOI \longrightarrow RCOCI_3 + 3\,NaOH$$
$$RCOCI_3 + NaOH \longrightarrow RCOONa + CHI_3$$

CHAPITRE IV

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ASPERGILLOMARASMINE B

Milieu de culture : "Czapek Dox" modifié :

Pour 1 litre H_2O :	glucose	40	g
	Na_2NO_3	3	g
	KH_2PO_4	1	g
	KCl	0,5	g
	$MgSO_4$	0,5	g
	$FeSO_4$	0,01	g
	$ZnSO_4$	0,001	g

On verse 250 ml de milieu de culture par boîte de Roux. Les milieux sont ensuite ensemencés avec une suspension de spores d'Aspergillus flavus oryzae, et incubés à l'étuve à 30° pendant 10 jours.

Procédé d'extraction :

1) Précipitation acétonique.

On filtre les jus de culture et on amène le pH à 9,5 par une solution d'ammoniaque. On ajoute ensuite 20 ml de $CaCl_2$ (solution à peu près molaire) et 10 g de phosphate tricalcique en poudre, par litre de milieu de culture, puis on verse lentement et en agitant, 3 volumes d'acétone. On laisse le mélange au repos, de préférence à une température voisine de 0°, pour permettre le dépôt du précipité. La plus grande partie du liquide surnageant est siphonée et rejetée. On centrifuge le précipité pour

éliminer le reste du liquide.

2) Redissolution de la substance.

Le précipité est remis en suspension dans 15 ml d'eau environ, en maintenant le pH à 9,5 avec l'ammoniaque. On centrifuge et on recueille le surnageant. Cette opération est recommencée trois fois et l'on réunit les liquides de lavage. Le précipité est rejeté.

3) Seconde précipitation acétonique.

Au liquide clair (environ 30 ml) on ajoute 5 ml d'une solution de $CaCl_2$ en maintenant le pH à 9,5. Ensuite on précipite avec 2,5 volumes d'acétone, recueille ce précipité par centrifugation et le sèche sous vide pendant environ 30 minutes.

Echange de Ca contre NH_4.

Le précipité est redissous dans environ 15 ml d'eau. Des fractions insolubles sont éliminées par centrifugation.

Le liquide clair est ensuite passé lentement sur une petite colonne d'amberlite IRC 50, chargée d'ions NH_4 par percolation. La substance B est éluée de la colonne avec de l'eau.

Cristallisation de la substance B.

L'éluat est refroidi à 2-3°, puis on ajoute goutte à goutte, et en agitant sans arrêt la solution, de l'acide sulfurique N jusqu'à ce que le pH soit à 3,2. On laisse le mélange au froid pendant 30 minutes environ. Si le liquide contient de l'aspergillomarasmine A, ce dernier commence à cristalliser. On ajoute alors très peu d'acide pour atteindre le pH 3 et au bout de quelques

instants on recueille les cristaux par centrifugation.

On amène ensuite le pH à 2,5 par addition d'acide. L'aspergillomarasmine B commence à cristalliser. On facilite la cristallisation en gelant le liquide. Pour recristalliser le produit on le redissout dans très peu d'eau et en présence de la quantité d'alcali nécessaire (10 ml de NaOH 0,1 N pour 278 mg d'aspergillomarasmine B) et on provoque la cristallisation en acidifiant la solution par H_2SO_4 jusqu'à pH 2,5. Par cette méthode on obtient environ 140 mg d'aspergillomarasmine B par litre de milieu de culture.

o o o

CHAPITRE V

ASPERGILLOMARASMINE A

Partie expérimentale

1. Analyse élémentaire.

trouvé % :	C 38,26	H 5,76	N 13,71	
	C 38,74	H 5,71	N 14,02	N-(CH_3) 1,43
	C 38,83	H 5,55	N 13,50	
pour $C_9H_{15}O_7N_3$, calculé % :	C 38,99	H 5,45	N 15,16	
pour $C_{10}H_{17}O_8N_3$, calculé % :	C 39,10	H 5,54	N 13,70	

2. Pouvoir rotatoire.

La substance est active vis-à-vis de la lumière polarisée.

Son pouvoir rotatoire mesuré dans HCl 6 N est $[\alpha]_D^{20°} = +25°$ (conc. = 1%)

dans NaOH 3 N $[\alpha]_D^{20°} = -7°$ (conc. = 1%)

et dans un tampon phosphate à pH 7 .. .. .. $[\alpha]_D^{20°} = -48°$ (conc. = 1%)

3. Chromatographie sur papier.

Dans le système n°IV, la substance A donne une tache avec un R_F de 0,10. Dans les systèmes n°I et III l'aspergillomarasmine A reste au point de départ. Dans le système n°II la substance A donne une tache ne migrant pas, et une autre avec un R_F de 0,02. L'acidité de ce système provoque probablement un début d'hydrolyse.

Toutes les taches observées sont colorées en pourpre par la ninhydrine.

4. Electrophorèse à haut voltage sur papier.

Sur papier Whatman n°1, dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5 à 750 volts, après 2 heures de migration, 500γ de substance A donnent deux taches après révélation à la ninhydrine. Une tache faible à la hauteur de la glycine, et une tache qui migre vers la cathode, très fortement colorée en pourpre à la révélation (voir fig.2). Dans ces conditions, l'acide cystéique témoin migre de 10,7 cm et l'aspergillomarasmine A de 12 cm.

5. Hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A.

Après 4 heures d'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6N en tubes scellés, à 120°, et chromatographie dans le système n°I, la substance A donne deux taches révélables à la ninhydrine. L'une possède un R_F de 0,15, identique à celui de l'acide aspartique. L'autre, de R_F 0,04, se colore également en pourpre, mais ne semble pas correspondre à un acide aminé connu.

6. Isolement de l'l'acide A" de l'aspergillomarasmine A.

Nous avons isolé l'acide aminé correspondant au R_F 0,04 de l'aspergillomarasmine A, après hydrolyse chlorhydrique, par chromatographie préparative. 300 mg d'aspergillomarasmine A ont été hydrolysés dans 6 ml d'acide chlorhydrique 6N en tube scellé à 120° pendant 4 heures.

L'hydrolysat a été amené à sec dans un dessicateur sur KOH et lavé trois fois à l'eau distillée pour chasser l'acide chlorhydrique. Ensuite nous avons repris l'hydrolysat dans 1 ml d'eau

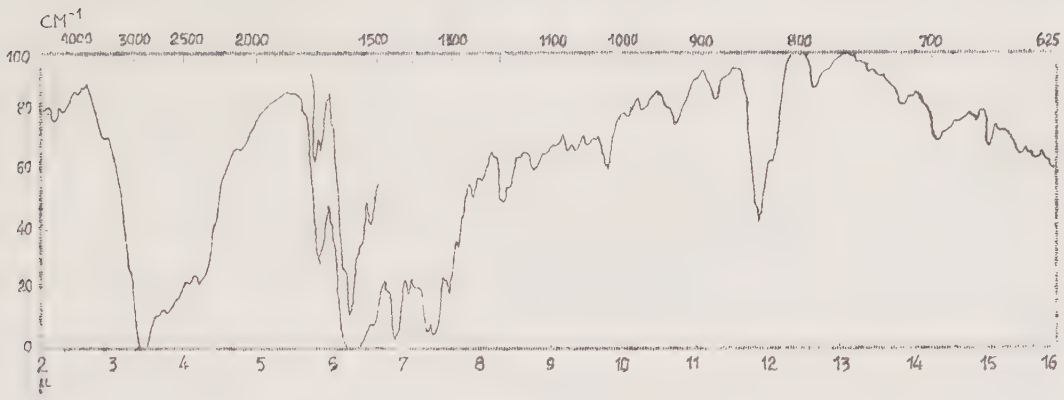


FIGURE 1

Spectre infrarouge de l'aspergillomarasmine A.

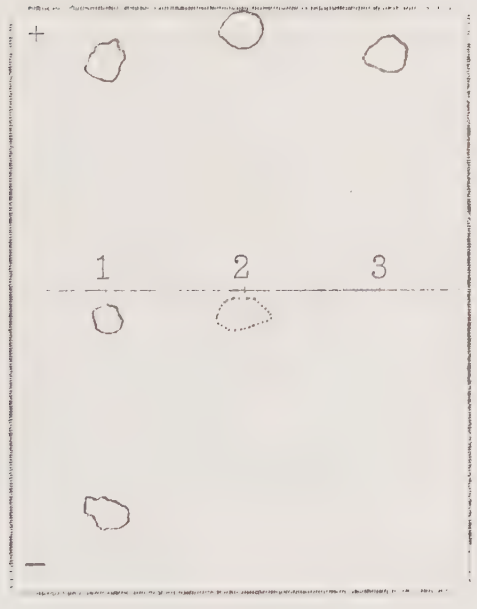


FIGURE 2

Electrophorèse à haut voltage sur papier.

1. Témoins : acide cystéique, glycocolle, arginine.
2. Aspergillomarasmine A.
3. "Acide A".

distillée et déposé à l'aide d'un capillaire sur du papier Whatman n°1. Nous avons laissé une marge de 4 cm sur les deux côtés du papier et la substance a été déposée en bande continue de 5mm de largeur environ. Le solvant de développement était le n°I et la durée de migration de 16 heures. Après séchage des papiers à 45°, nous avons découpé une bande de 5 cm de large sur les deux côtés du papier et une bande de 1 cm de large environ au milieu. Ces bandes ont été révélées à la ninhydrine et en nous basant sur les colorations ainsi obtenues nous avons découpé la bande correspondant à l'acide aminé inconnu.

Ces bandes ont été éluées à l'eau distillée et l'eau a été évaporée ensuite à 40-50° sous vide, à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L'acide A isolé (100 mg) se présente sous forme amorphe, très hygroscopique. Nous n'avons pas réussi à l'obtenir sous forme cristalline et n'avons pu préparer de picrate ou de chlorhydrate cristallisés.

Selon son comportement à l'électrophorèse à haut voltage, sur papier Whatman n°1, dans le tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5, 750 v, après 2 heures de migration, ce produit semble être très acide. Dans ces conditions, l'acide cystéique migre de 10,1 cm et l'acide A migre de 10,3 cm vers la cathode (voir fig.2).

Par chromatographie sur papier dans le système n°I, le R_F de l'acide A est de 0,03 et dans le système n°IV le R_F est de 0,21.

° ° °

CHAPITRE VI

ASPERGILLOMARASMINE B

Partie expérimentale

1. Analyse élémentaire :

trouvé % :	C 39,22	H 5,75		N 10,01
	C 38,98	H 5,01	O 45,80	N 10,09
	C 39,36	H 5,04		N 10,32
	C 38,97	H 5,14		N 9,88
	$C\text{-}(CH_3)$	traces		
	$N\text{-}(CH_3)$	1,08 - 1,11 %		
pour $C_9H_{14}O_8N_2$, calculé % :	C 38,84	H 5,07	O 46,04	N 10,07
(ou $C_9H_{12}O_7N_2$, H_2O)				

On ne trouve pas d'azote aminé libre par la méthode de Van Slyke.

2. Pouvoir rotatoire.

Le pouvoir rotatoire de l'aspergillomarasmine B mesuré dans un tampon phosphate à pH 7 est: $[\alpha]_D^{20°} = -20°$ (conc. 1%)

dans l'acide chlorhydrique 6 N .. ..: $[\alpha]_D^{20°} = +13°$ (conc. 1%)

dans la soude 3 N .. ..: $[\alpha]_D^{20°} = -2,6°$ (conc. 1%)

3. Chromatographie sur papier.

Nous donnons la liste des R_F obtenus dans différents systèmes de solvants après révélation par la ninhydrine :

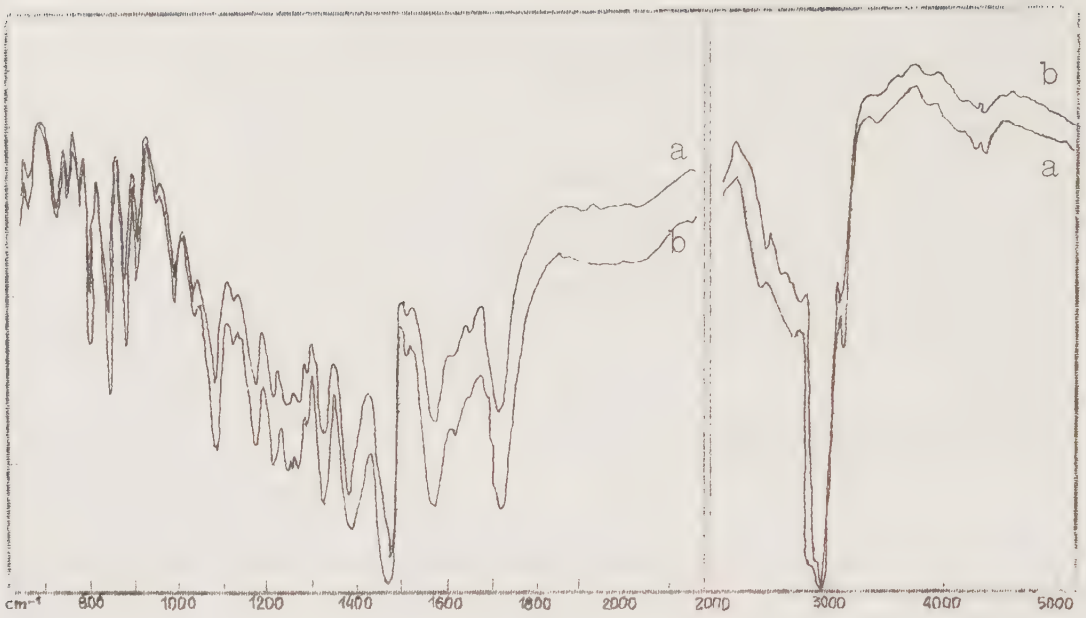


FIGURE 3

Spectres infrarouges de l'aspergillomarasmine B (a) et de l'acide lycomarasmique (b).

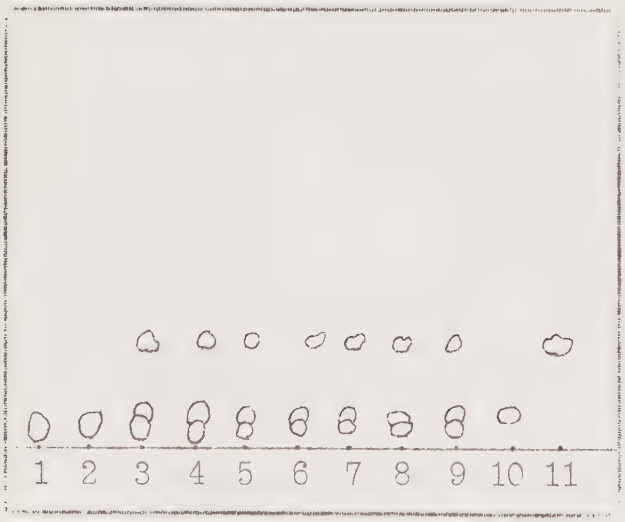


FIGURE 4

Cinétique d'hydrolyse de l'aspergillomarasmine B dans l'acide chlorhydrique 6 N à 120° dans tubes scellés.

1. Aspergillomarasmine B non hydrolysé. hydrolysé.
2. id. après 10 min. d'hydrolyse.
3. id. après 25 min. d'hydrolyse.
4. id. après 35 min. d'hydrolyse.
5. id. après 45 min. d'hydrolyse.
6. id. après 55 min. d'hydrolyse.
7. id. après 1^h05 min. d'hydrolyse.
8. id. après 1^h15 min. d'hydrolyse.
9. id. après 2 heures d'hydrolyse.
10. Acide L-aspartique.
11. Glycocolle.

Dans le système n°V une tache pourpre, $R_F = 0,16$
Dans le système n°I une tache pourpre, $R_F = 0,0$
Dans le système n°III une tache pourpre, $R_F = 0,0$
Dans le système n°IV deux taches; une se colorant en pourpre, $R_F = 0,16$
et une tache se colorant en jaune,

avec un R_F de 0,28, correspondant à l'anhydro-aspergillomarasmine B. Le pH acide (4,5) du solvant de développement provoque probablement un début d'hydrolyse chez la substance B et il y a formation de l'anhydro-aspergillomarasmine B. Le même phénomène se produit dans le système II. On obtient une tache avec un R_F de 0,20 se colorant en pourpre et une autre tache avec un R_F de 0,30 se colorant en jaune à la ninhydrine.

4. Electrophorèse à haut voltage sur papier.

Sur papier Whatman n°1, dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 3,6, à 900 volts, après 2 heures de migration et après révélation à la ninhydrine, l'aspergillomarasmine B est à 4,1cm du point de départ vers la cathode, tandis que l'acide cystéique témoin migre de 7,2cm dans la même direction (fig.5, p.34).

Dans les mêmes conditions mais à pH 6,5, après 1^h15, la substance B migre de 4,75 cm vers la cathode, et l'acide cystéique de 4,65 cm. Après deux heures de migration, la substance B est à 17,6 cm du point de départ vers la cathode et l'acide cystéique à 15,4 cm. On peut supposer que le point isoélectrique de l'aspergillomarasmine B est aux environs de pH 2, car à pH 3,6 elle est déjà peu mobile. Selon ces électrophorèses on peut constater que la substance B ne contient pas d'impureté révélable à la ninhydrine (fig.6 et 7, pp.34 et 35).

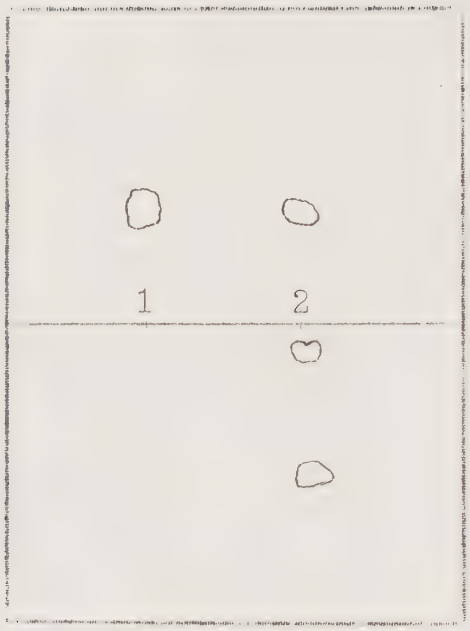


FIGURE 5

Electrophorèse à haut voltage sur papier, dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 3,6 , à 900 v. Durée de la migration : 2 heures.

1. Aspergillomarasmine B.
2. Témoins : acide cystéique, glycocolle, arginine.

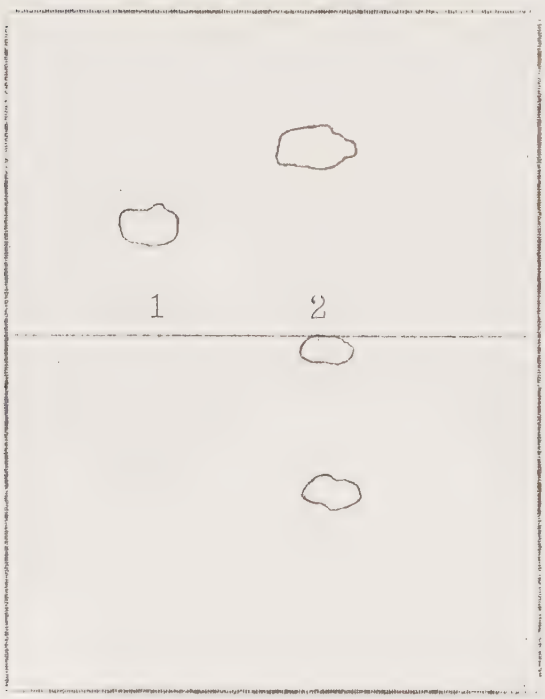


FIGURE 6

Electrophorèse à haut voltage sur papier, dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5, à 900 v. Durée de la migration: 1^h15 min.

1. Aspergillomarasmine B.
2. Témoins : acide cystéique, glycocolle, arginine.

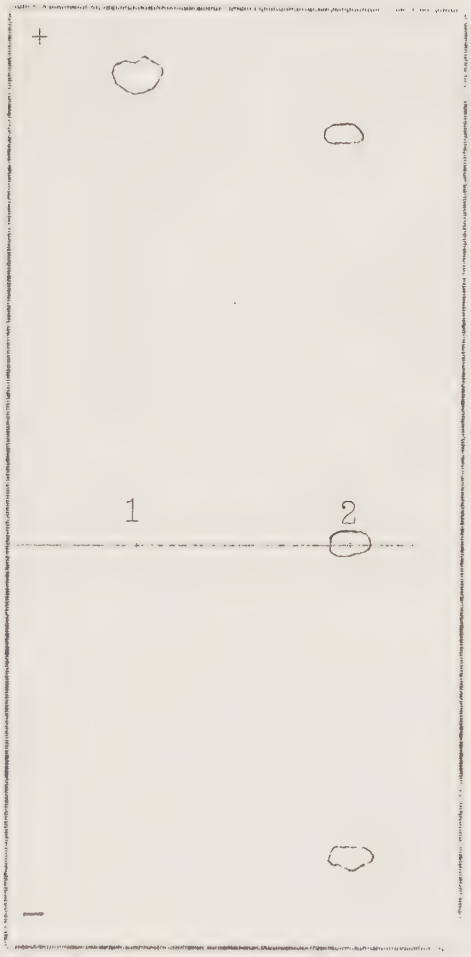


FIGURE 7

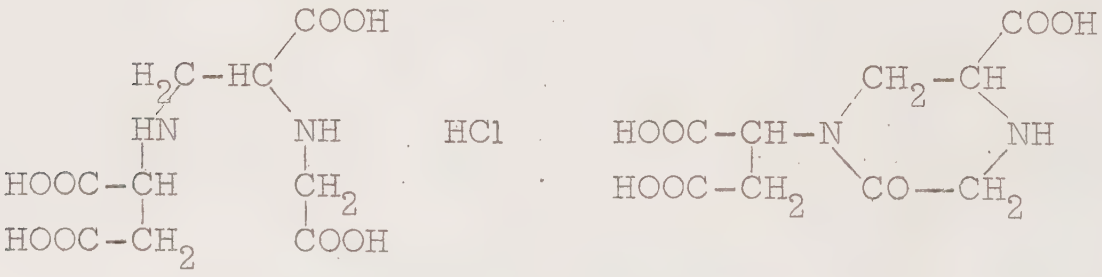
Electrophorèse à haut voltage sur papier, dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5, à 900 v. Durée de la migration : 2 heures.

1. Aspergillomarasmine B.
2. Témoins : acide cystéique,
   glycocolle,
   arginine.

5. Etude de l'hydrolyse acide.

Après hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B dans l'acide chlorhydrique 6 N à 120°, en tube scellé, pendant 25 minutes, on obtient l'anhydro-aspergillomarasmine B, du glycocolle et de l'acide aspartique. Le début de l'hydrolyse est donc relativement facile. Dans des conditions moins énergiques, par exemple à 37°, dans la même concentration d'acide chlorhydrique, après 5 heures d'hydrolyse, ou bien en dissolvant l'aspergillomarasmine B dans l'acide chlorhydrique 2 N sans chauffer, on obtient sur les chromatographies la tache jaune correspondant à l'anhydro-aspergillomarasmine B. Par contre, il est très difficile d'obtenir une hydrolyse totale de la substance B. Après l'avoir hydrolysée dans l'acide chlorhydrique 2 N à 120° pendant 7 jours en tube scellé, ou pendant 3 jours dans l'acide chlorhydrique 6 N à la même température, le chromatogramme, révélé par la ninhydrine, montre la présence, en dehors de la glycine et de l'acide aspartique, de la tache jaune restant au point de départ, correspondant à l'anhydro-aspergillomarasmine B.

Le schéma d'hydrolyse serait le suivant :



aspergillomarasmine B (VI) — HCl → anhydro-aspergillomarasmine B (VII) — HCl → glycocolle, acide aspartique + fragment en C_3

6. Cinétique d'hydrolyse.

Pour établir l'ordre d'apparition des produits d'hydrolyse à partir de l'aspergillomarasmine B nous avons procédé de la façon suivante :

Une série de tubes scellés, contenant chacun 1 mg de substance B dans 1 ml d'acide chlorhydrique 6 N, a été portée à 120°. Les tubes ont été ouverts dans les intervalles de temps suivants : 0 minutes, 10 min., 25 min., 35 min., 45 min., 55 min., 1^h05, etc. jusqu'à 20 heures d'hydrolyse. Le contenu des tubes a été évaporé dans un dessicateur sur KOH, et après avoir repris les résidus dans de l'eau distillée, nous les avons chromatographiés dans le système III sur papier Whatman n°3. La figure 4 (p.32) montre que les deux acides aminés se libèrent en même temps et sont révélables à la ninhydrine à partir de 25 minutes d'hydrolyse.

7. Dosage quantitatif des acides aminés.

Pour doser les deux acides aminés de l'aspergillomarasmine B nous avons utilisé une colonne d'Amberlite C.G. 120 selon la méthode de Moore, Spackman et Stein (18, 19). Un premier dosage a été effectué après 3 jours d'hydrolyse de l'aspergillomarasmine B dans l'acide chlorhydrique 6 N, à 110° en tube scellé. Nous avons trouvé 27,68 % d'acide aspartique et 18,54 % de glycocolle (rapport molaire acide aspartique/glycocolle = 0,84).

La chromatographie sur papier de cette hydrolyse dans le système de développement n°IV montre, en dehors de l'acide aspartique et du glycocolle, la tache jaune correspondant à l'anhydro-aspergillomarasmine B, c'est-à-dire que l'hydrolyse, après trois jours, n'est toujours pas totale.

Un deuxième dosage a été effectué sur un échantillon de la substance B hydrolysée pendant 8 jours dans les conditions mentionnées. Nous avons trouvé 34,58 % d'acide aspartique et 21,05 % de glycocolle. Le rapport molaire acide aspartique/ glycocolle est de 0,92. La chromatographie sur papier de cet hydrolysat indique la présence des deux acides aminés, sans la tache jaune (hydrolyse totale).

La quantité d'acides aminés mis en évidence par les dosages ne représente que 55,63 % de la substance de départ et ne justifie que 7,62 % d'azote dans cette dernière. Or la teneur en azote de la substance B est de 10,07 %.

Etant donné que l'azote de la substance B provient uniquement de ces deux acides aminés, il faut conclure qu'au cours d'une longue hydrolyse dans de l'acide chlorhydrique concentré les acides aminés sont partiellement détruits.

On a effectué à la S.E.A.B. des dosages quantitatifs de ces acides aminés par une autre méthode (20), dont le principe est le suivant : les acides aminés forment avec le cuivre des complexes, contenant 2 acides aminés pour 1 Cu. Le métal est adsorbé sur la résine Dowex 50, dans un tampon phosphate pH 7,8. Les acides aminés prennent le Cu à la résine, et ils forment des complexes solubles. Le métal mis en solution est dosé ensuite par iodométrie en présence d'amidon ou par complexométrie en présence de murexide. Les chiffres trouvés selon cette méthode sont compris, pour la glycine entre 18 et 24%, ce qui correspond à nos résultats, mais pour l'acide aspartique on a trouvé 38,5-49%. Ce dernier chiffre est plus élevé que le nôtre.

On a donc retrouvé en acides aminés 73 % de la substance de départ. Ce pourcentage permet d'attribuer à la substance B une teneur en azote de 9,6 %. Ces chiffres sont plus proches de

la réalité. Selon la formule V, après une hydrolyse totale on devrait trouver environ 50% d'acide aspartique et 28% de glycocolle, tandis qu'avec la formule VI, dans les mêmes conditions, on devrait trouver 47% d'acide aspartique et 27% de glycocolle.

8. Isolement et identification de l'acide aspartique provenant de la substance B.

Les deux acides aminés de l'aspergillomarasmine B, après une hydrolyse de 10 jours dans de l'acide chlorhydrique 6 N à 120°, en tube scellé, ont été séparés sur une colonne d'Amberlite IR 45 A.G. Le glycocolle a été élué à l'eau distillée, par fractions de 2 ml. Ces fractions ont été testées à la ninhydrine. Après avoir élué le glycocolle, nous avons élué l'acide aspartique par l'acide chlorhydrique N. Les prélèvements contenant l'acide aspartique pur ont été rassemblés et amenés à sec sous vide. A partir de 50 mg d'aspergillomarasmine B nous avons obtenu 17 mg d'acide aspartique. Le pouvoir rotatoire de l'acide aspartique isolé de la substance B, mesuré dans l'acide chlorhydrique 6 N, est de $[\alpha]_D^{20°} = +18,57°$, celui de l'acide L-aspartique témoin, dans les mêmes conditions, est: $[\alpha]_D^{20°} = +24,6°$. Nous pouvons donc conclure que l'acide aspartique isolé de l'aspergillomarasmine B est de la série L.

9. Réaction à la 2,4-dinitrophénylhydrazine (21).

300 mg de substance B ont été hydrolysés dans 35 ml d'acide chlorhydrique 2 N, sous reflux pendant 14 heures, en présence de 300 mg de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Après refroidissement de l'hydrolysat, nous avons obtenu 30 mg de produit cristallisé. Les cristaux ont été dissous dans de la soude 0,01 N;

cette solution de sels de sodium a été extraite par le benzène. La phase benzénique, contenant des impuretés, a été éliminée et la phase aqueuse, après avoir été acidifiée par l'acide chlorhydrique 0,01 N, a été extraite trois fois par le benzène et ensuite par l'éther, car nous avons observé un précipité insoluble dans le benzène. Les phases benzénique et éthérée ont été lavées à l'eau, séchées sur sulfate de sodium, et amenées à sec sous vide.

Les deux fractions donnent des produits jaunes cristallisés. Les cristaux de la fraction soluble dans le benzène fondent en se décomposant à 205-210°. Le résidu sec de la fraction éthérosoluble donne un point de décomposition compris entre 206-213°. Le maximum d'adsorption dans l'éthanol des deux fractions, est à 360 mμ pour la fraction soluble dans l'éther et à 360-362 mμ pour la fraction soluble dans le benzène.

La chromatographie sur papier dans les systèmes de solvants butanol-éthanol-eau (5:1:4) montre que les deux fractions donnent chacune deux taches.

Les R_F : 1) Fraction soluble dans le benzène 0,62
0,45 (plus intense)
2) Fraction soluble dans l'éther 0,64 (plus intense)
0,51

Les résultats de l'analyse élémentaire sont les suivants:

1) Fraction soluble dans le benzène :
trouvé % : C 43,64 H 3,81 N 18,07

2) Fraction soluble dans l'éther :
trouvé % : C 42,54 H 3,73 N 18,06

$C_{11}H_{12}O_6N_4$, calculé % : C 42,31 H 3,87 N 17,95

Une telle formule brute correspondrait à une substance en $C_5H_8O_3$. Les résultats expérimentaux en notre possession ne

nous permettent pas encore d'interpréter ce fait.

10. Oxydation par l'acide chromique (22, 23).

Nous avons oxydé 10 mg d'aspergillomarasmine B par l'acide chromique, d'après la méthode de Kuhn-Roth modifiée par Schmidt et Karrer. Les fractions volatiles sont entraînees à la vapeur et recueillies dans de l'eau contenant quelques gouttes d'éthylamine. Ensuite on concentre et chromatographie les sels d'éthylamine dans le système butanol-saturé d'eau (chromatographie circulaire). Après révélation par le vert de bromocrésol, nous avons obtenu une faible tache correspondant à l'acide acétique et une autre, correspondant à l'acide formique. Ces résultats sont en contradiction avec des résultats de dosages de C-méthyle qui étaient toujours négatifs.

11. Hydrolyse alcaline.

125 mg de substance B et 2,5 ml d'éthylène glycol ont été chauffés sous reflux pendant 10 minutes. Ensuite nous avons ajouté quelques pastilles de potasse et continué le reflux pendant trois heures.

Après refroidissement de l'hydrolysat, nous l'avons acidifié par l'acide chlorhydrique 5 N et nous l'avons extrait quatre fois par l'éther. L'extrait a été séché sur du sulfate de sodium et amené à sec. Nous avons obtenu un produit huileux. En supposant que, par ce procédé, nous ayons extrait des acides gras pouvant se former pendant l'hydrolyse, nous avons chromatographié les sels d'éthylamine de ce produit dans le système butanol saturé d'eau de la même façon que précédemment. Après révélation par le vert de bromocrésol nous avons obtenu

des taches de R_F identiques à ceux de l'acide acétique et de l'acide propionique authentiques.

Nous avons répété la même expérience avec un mélange de glycocolle et d'acide aspartique, et nous avons chromatographié l'extrait éthérosoluble. La chromatographie montre l'acide acétique, mais pas d'acide propionique. Il semble donc que la formation d'acide propionique provienne de l'hydrolyse de la partie centrale de la molécule.

12. Ester méthylique préparé par action du diazométhane sur l'aspergillomarasmine B.

a) Méthylation incomplète.

Réactif : On introduit dans un erlenmeyer 5 ml de NaOH à 30% et 40 ml d'éther. Après avoir bien refroidi ce mélange, on ajoute 1 g de nitrosométhylurée, et on le remet à la glacière pour une heure environ. La solution est ensuite décantée sur des pastilles de KOH et distillée avant emploi.

Méthode de méthylation : Pour catalyser la réaction de méthylation il faut ajouter quelques gouttes d'eau distillée sur la substance qui réagit ensuite très fortement avec le réactif. Au fur et à mesure de la méthylation, la substance entre en solution dans l'éther. Avant que toute la substance ne soit méthylée, on décante le surnageant et on évapore l'éther sous vide et à froid. Les esters ainsi obtenus se sont montrés instables et nous avons été obligés d'estérifier la substance immédiatement avant chaque examen spectrographique.

b) Méthylation complète.

On prépare le réactif de la même manière que précé-

demment, mais avec de l'éther purifié.

Purification de l'éther : Agiter avec une solution légèrement sulfurique de sulfate ferreux. Laisser une heure en contact. Laver ensuite l'éther à l'eau, puis par NaOH 2 N. Distiller sur KOH. Laisser une nuit sur $CaCl_2$, distiller après décantation. Redistiller sur chlorure de sodium.

La méthode de méthylation est la même que dans le cas de méthylation incomplète, sauf que l'on ajoute le réactif à la substance jusqu'à ce que tout le produit entre en solution. On évapore l'éther sous vide à froid et on distille l'ester obtenu dans un tube à boules. L'ester distille entre 140-150°, et se présente sous forme d'une huile jaune claire, visqueuse.

Analyse élémentaire :

Trouvé %: C 47,80; H 6,90; N 8,13; O-(CH_3) 17,58; N-(CH_3) 2,30
(évalué en % CH_3 par mole)

$C_{13}H_{22}O_8N_2$

Calculé %: C 46,80; H 6,60; N 8,39; O-(CH_3) 17,99
(évalué en % CH_3 par mole)

Les résultats des analyses d'esters sont faiblement perturbés, par le fait que le diazométhane introduit des méthyles dans l'azote.

13. Transformation de l'aspergillomarasmine B en anhydro-aspergillomarasmine B.

a) En milieu acide.

500 mg d'aspergillomarasmine B sont mis en suspension dans 20 ml d'eau. On ajuste le pH de la suspension à 5 à l'aide de 2 ml d'une solution de NaOH N. On chauffe le mélange au bain-marie à 60°, puis on amène le pH en dessous de 1 avec une solu-

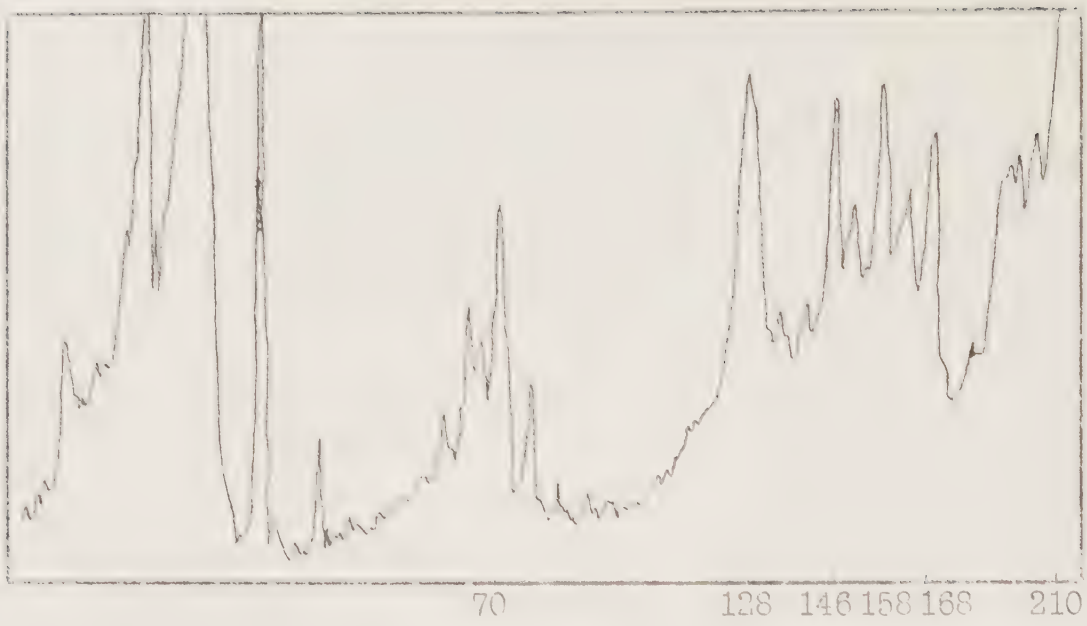


FIGURE 8

Spectre de résonance magnétique nucléaire (NMR) de l'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B en solution dans le tétrachlorure de carbone (méthylation par des quantités insuffisantes de diazométhane). Solvant de référence : tétraméthylsilane (TMS).

tion d'acide chlorhydrique 5 N. On continue de chauffer le mélange à 60° pendant 15 minutes, puis on le laisse refroidir à 15°. On remonte ensuite le pH à 2,3 à l'aide d'une solution de soude et on met le tube à 0°. Le lendemain on filtre les cristaux formés et on les lave avec un mélange d'alcool-éther 1:1, puis on les sèche sous vide. Poids recueilli : 165 mg.

b) Dans l'eau.

32 mg d'aspergillomarasmine B sont mis en suspension dans 1,5 ml d'eau distillée. On chauffe cette suspension en tube scellé à 95-98° pendant trois heures et demie. Au cours du chauffage la substance passe en solution. On met ensuite le tube à 0°

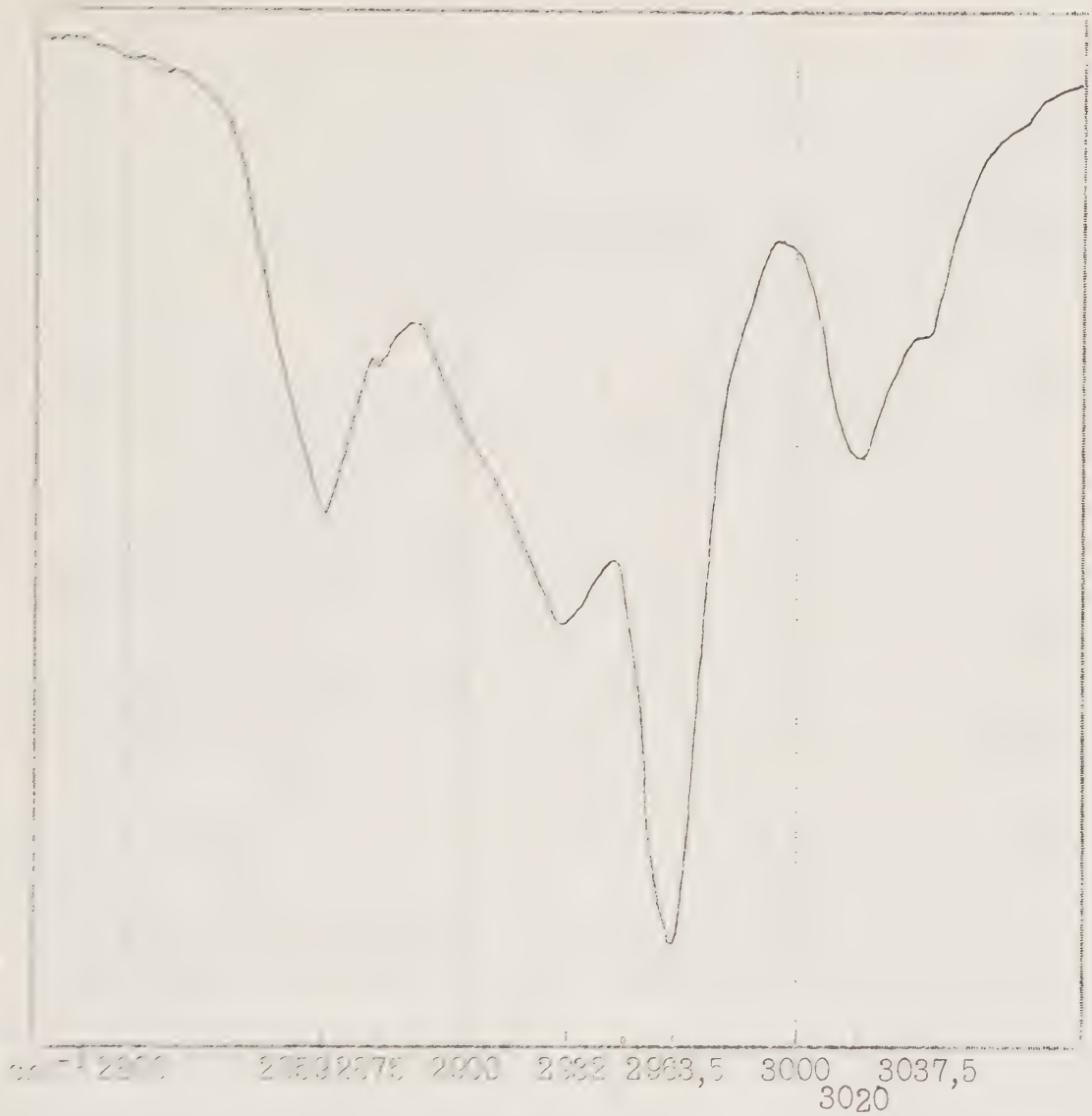


FIGURE 9

Spectre I.R. de l'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B. (Méthylation par sulfate de méthyle.)

et on laisse le produit cristalliser durant 24 heures. On filtre les cristaux et on les sèche sous vide. On obtient 14 mg d'anhydro-aspergillomarasmine B.

Nous avons prouvé la transformation de l'aspergillomarasmine B en anhydro-aspergillomarasmine B par analyse élémentaire, spectrographie I.R. et chromatographie sur papier.

° ° °

CHAPITRE VII

ANHYDRO-ASPERGILLOMARASMINE B

1. Analyse élémentaire.

trouvé %: C 41,32 H 4,62 N 10,85
N 10,68
N 10,38

traces de C-(CH_3) et 1,15 % de N-(CH_3)

$C_9H_{12}O_7N_2$, calculé %: C 41,53 H 4,61 N 10,75

On ne trouve pas d'azote aminé libre par la méthode de Van Slyke.

2. Pouvoir rotatoire.

L'activité vis-à-vis de la lumière polarisée, mesurée dans un tampon phosphate à pH 7, est $[\alpha]_D^{20°} = -103°$ (conc. = 1%)

dans l'acide chlorhydrique 6 N .. .. $[\alpha]_D^{20°} = -106°$ (conc. = 1%)

dans NaOH 3 N .. .. $[\alpha]_D^{20°} = -102°$ (conc. = 1%)

3. Chromatographie sur papier.

Dans le système pyridine-acide acétique-eau (IV), l'anhydro-aspergillomarasmine B donne une tache de R_F 0,28, qui se colore en jaune à la ninhydrine. Dans les systèmes de solvants I et III, cette substance donne une tache ne migrant pas, et qui se colore également en jaune à la ninhydrine.

4. Electrophorèse à haut voltage sur papier.

Après deux heures de migration dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5, à 750 volts, l'anhydro-aspergillomarasmine B donne une tache jaune (révélée par la ninhydrine) migrant de 13,25 cm vers la cathode et une faible tache visible à l'U.V., migrant de 11,5 cm dans la même direction. Cette tache peut être une impureté. L'acide cystéique témoin migre de 10,8 cm vers la cathode dans les mêmes conditions (voir fig. 11, p. 48).

5. Résultats de l'hydrolyse acide.

Après hydrolyse pendant 2 heures dans l'acide chlorhydrique 6 N à 110°, en tube scellé, on trouve des quantités équimoléculaires d'acide aspartique et de glycocolle. Par électrophorèse de cet hydrolysat à haut voltage (dans un tampon pyridine-acide acétique à pH 6,5) à 750 volts, après deux heures de migration, on trouve l'acide aspartique, le glycocolle et une tache jaune correspondant à la substance non hydrolysée (voir fig. 12, p. 49).

6. Estérification de l'anhydro-aspergillomarasmine B.

Nous avons préparé l'ester méthylique de l'anhydro-aspergillomarasmine B par la même méthode que celle utilisée pour l'aspergillomarasmine B (méthylation incomplète et méthylation complète)(voir chapitre précédent).

L'analyse élémentaire de l'ester méthylique préparé par action du diazométhane sur l'anhydro-aspergillomarasmine B (méthylation complète) donne les résultats suivants :

trouvé % : C 48,79 H 6,56 N 7,86 O-(CH_3) 13,09

$C_{12}H_{18}O_7N_2$, calculé % : C 47,70 H 5,96 N 19,26 O-(CH_3) 14,90

(les valeurs de méthoxyle sont données en méthyle % par mole.)

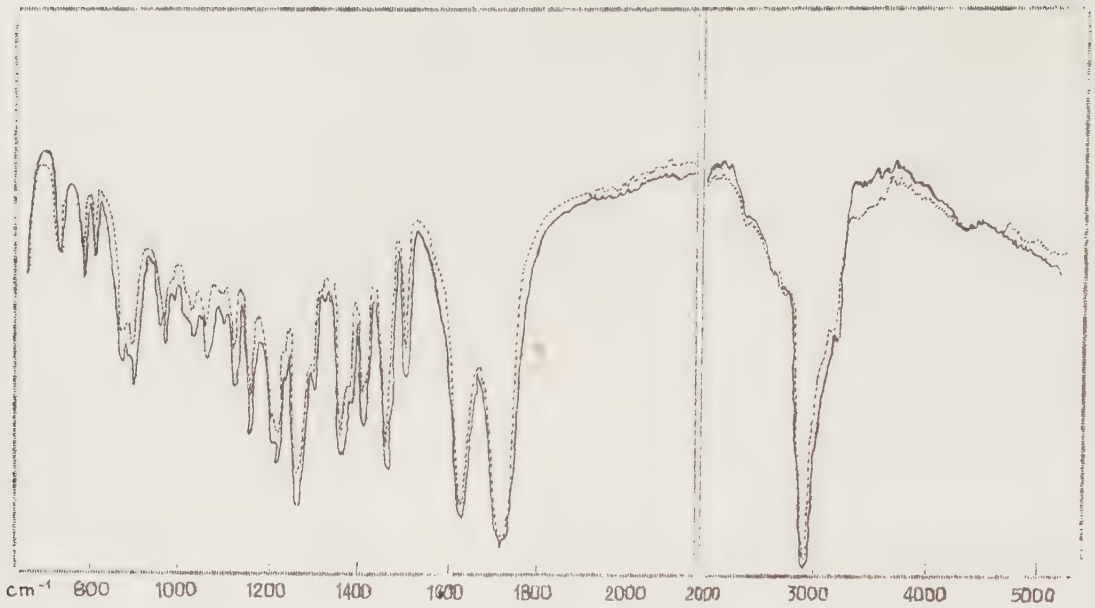


FIGURE 10

Spectres infrarouges de l'anhydro-aspergillomarasmine B (——) et de la substance J (---)(en suspension dans le nujol).

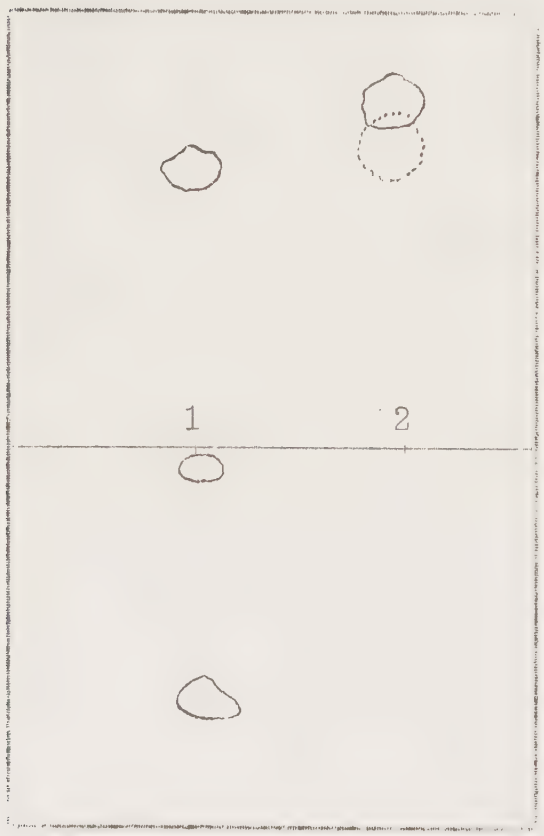


FIGURE 11

Electrophorèse à haut voltage sur papier de l'anhydro-aspergillo-marasmine B (pH: 6,5; 750 v).

1. Témoins : acide cystéique,
   glycocolle,
   arginine.
2. Anhydro-aspergillomarasmine B.

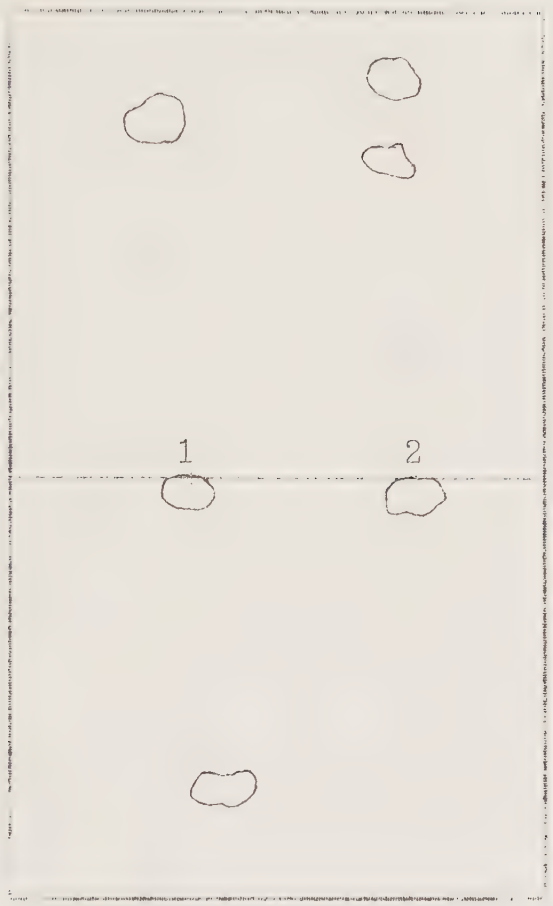
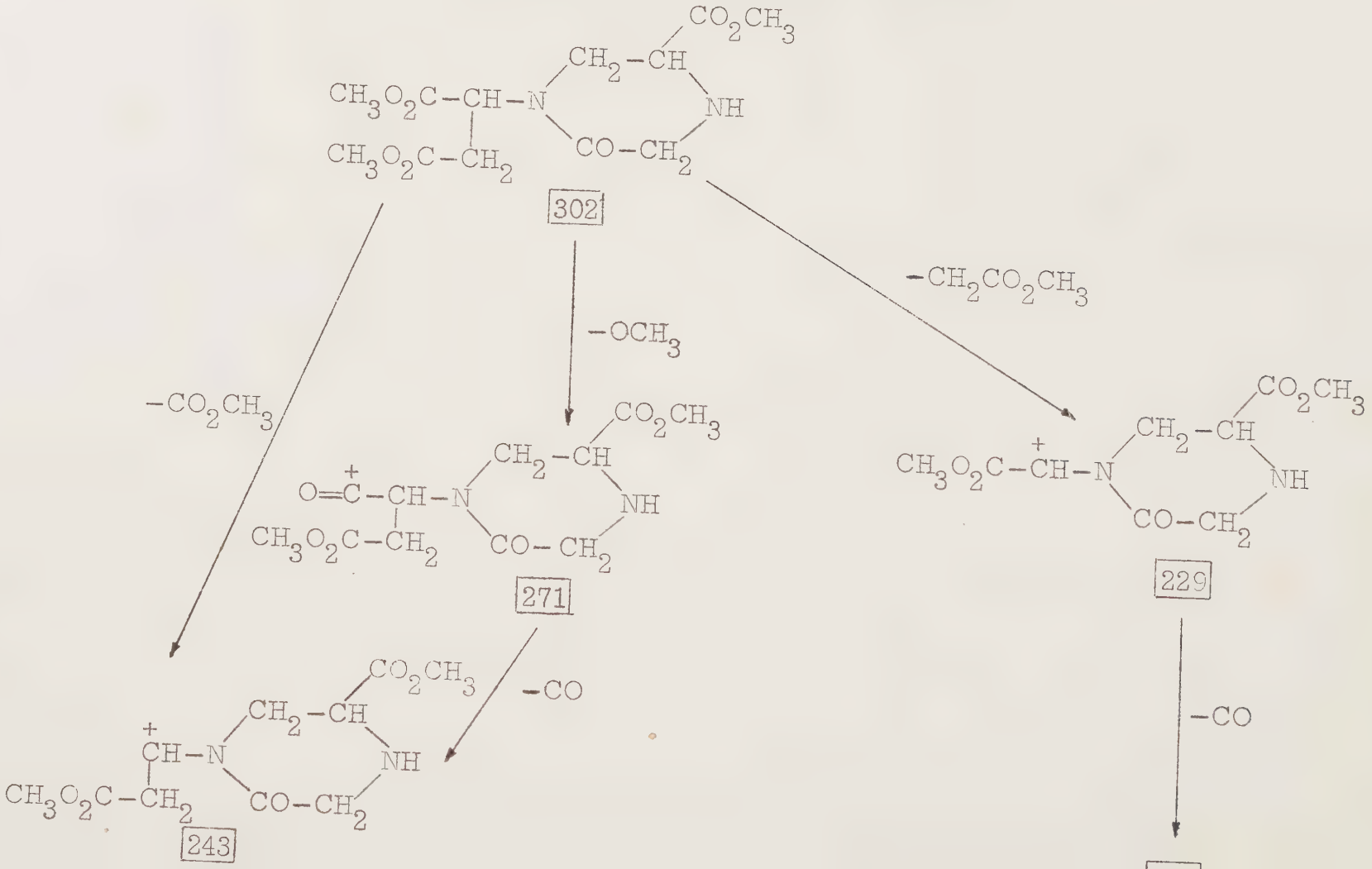


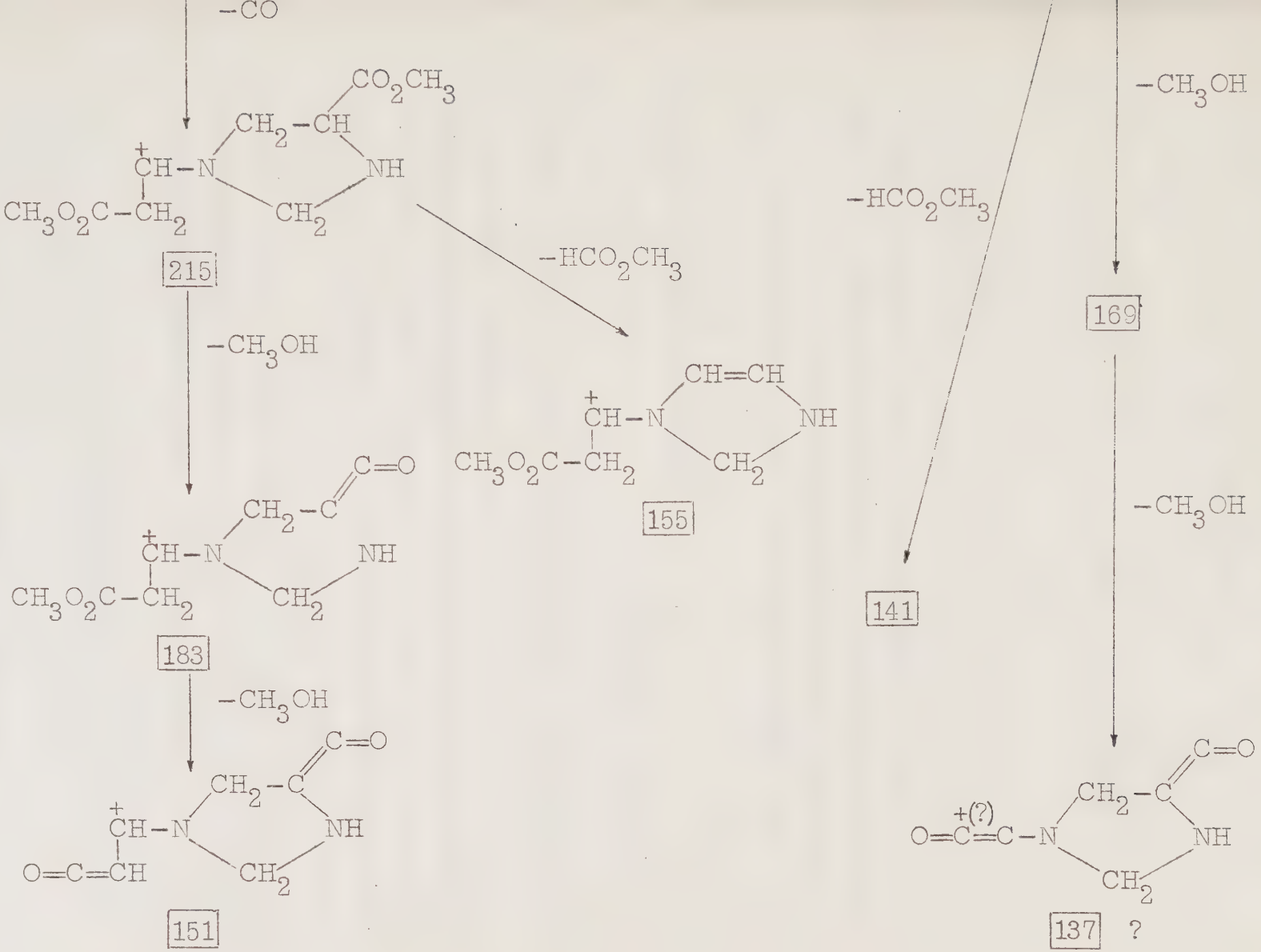
FIGURE 12

Electrophorèse à haut voltage sur papier
de l'anhydro-aspergillomarasmine B hydrolysé.

1. Témoins : acide cystéique,
   glycocolle,
   arginine.
2. Anhydro-aspergillomarasmine B hydrolysé.

Schéma de dégradation de l'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B et de l'anhydro-aspergillomarasmine B. - Spectrographie de masse. (Méthylation : par méthanol chlorhydrique)




−CO
−CH3OH
−HCO2CH3
215
155
169
183
141
151
137
?

CHAPITRE VIII

SYNTHESE DU MALONOYL NN'BISGLYCINE

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, nous avions pensé que l'aspergillomarasmine B pouvait avoir la structure d'une diamide, dans laquelle les deux acides aminés seraient fixés sur les deux carboxyles d'un acide dicarboxylique. Nous avons alors entrepris la synthèse d'une telle diamide.

Nous avons préparé l'ester benzylique du glycocolle, que nous avons fixé sur l'acide malonique à l'aide du dicyclohexylcarbodiimide. Les groupements carboxyliques de la diamide ont été libérés par hydrogénolyse.

1. Préparation du p-toluènesulfonate du glycocollate de benzyle(24).

Des quantités équimoléculaires de glycocolle et d'acide p-toluènesulfonique sont chauffées en présence d'alcool benzylique et de benzène sous reflux dans un appareil de Dean et Stark jusqu'à l'évacuation complète de l'eau. Le p-toluènesulfonate du glycocollate de benzyle est précipité avec de l'éther, et le précipité est ensuite recristallisé du mélange méthanol-éther. On obtient une poudre blanche, cristalline. Les cristaux sont en forme d'aiguilles fines, et fondent à 122-124°. (La littérature indique un point de fusion de 132-134°.)

Résultats des analyses élémentaires :

	trouvé % :	C 56,70	H 5,68	N 4,07	S 9,95
$C_{16}H_{20}O_5NS$,	calculé % :	C 56,70	H 5,94	N 4,13	S 9,47

2. Libération de l'ester benzylique (25).

Le paratoluènesulfonate du glycocollate de benzyle est mis en suspension dans du chloroforme fraîchement distillé. A 0°, on ajoute à la suspension du chloroforme, contenant 2% d'ammoniac. Le p-toluènesulfonate d'ammonium précipite. Après 30 minutes environ, on ajoute au mélange de l'éther sec et on filtre le produit. Le surnageant est concentré sous vide. A partir de 2 g de produit de départ nous avons obtenu 800 mg d'ester benzylique, sous forme d'une huile jaune pâle. Il est recommandé de continuer la synthèse tout de suite après la libération des esters, car ces esters sont très instables; en quelques heures ils se transforment en dicétopipérazines dès la température ambiante (26).

3. Préparation de la diamide.

Nous avons fait réagir l'acide malonique pulvérisé, sec, avec l'ester benzylique du glycocolle à l'aide de NN' dicyclohexylcarbodiimide. Cette méthode simple et rapide n' st répandue dans la synthèse des peptides et des amides que depuis 1955 (27, 28), bien que les carbodiimides aient été étudiées pour la première fois en 1874 (29).

D'après Khorana (30), le mécanisme de la réaction est le suivant :

$$RCOOH + R'NH_2 + C_6H_{11}N{=}C{=}NH_{11}C_6 \longrightarrow RCONHR' + C_6H_{11}NHCONH_{11}C_6$$

Il y a formation de NN' dicyclohexylurée qui précipite et qui est pratiquement insoluble dans la plupart des solvants.

Un article de Buzas (31) décrit les conditions favorables pour des rendements élevés dans la synthèse des amides à l'aide des carbodiimides.

On mélange 0,006 moles d'ester benzylique dans

10 ml de dioxane avec 0,003 moles d'acide malonique avec agitation magnétique, à la température ambiante. Après dissolution de l'acide malonique, on ajoute 0,006 moles de réactif et on continue à agiter le mélange. 10-15 minutes après avoir ajouté le carbodiimide, nous avons observé la formation de l'urée. Selon Buzas, dès que l'urée précipite, la réaction est terminée. Nous avons laissé la réaction se poursuivre pendant 16 heures, car nous avons remarqué que l'élimination de l'urée est plus facile dans ces conditions. Après avoir filtré l'urée, on évapore le dioxane sous vide. Le produit est recristallisé dans le mélange chloroforme-éther. Le point de fusion de la substance est de 120-123°.

Analyse élémentaire :

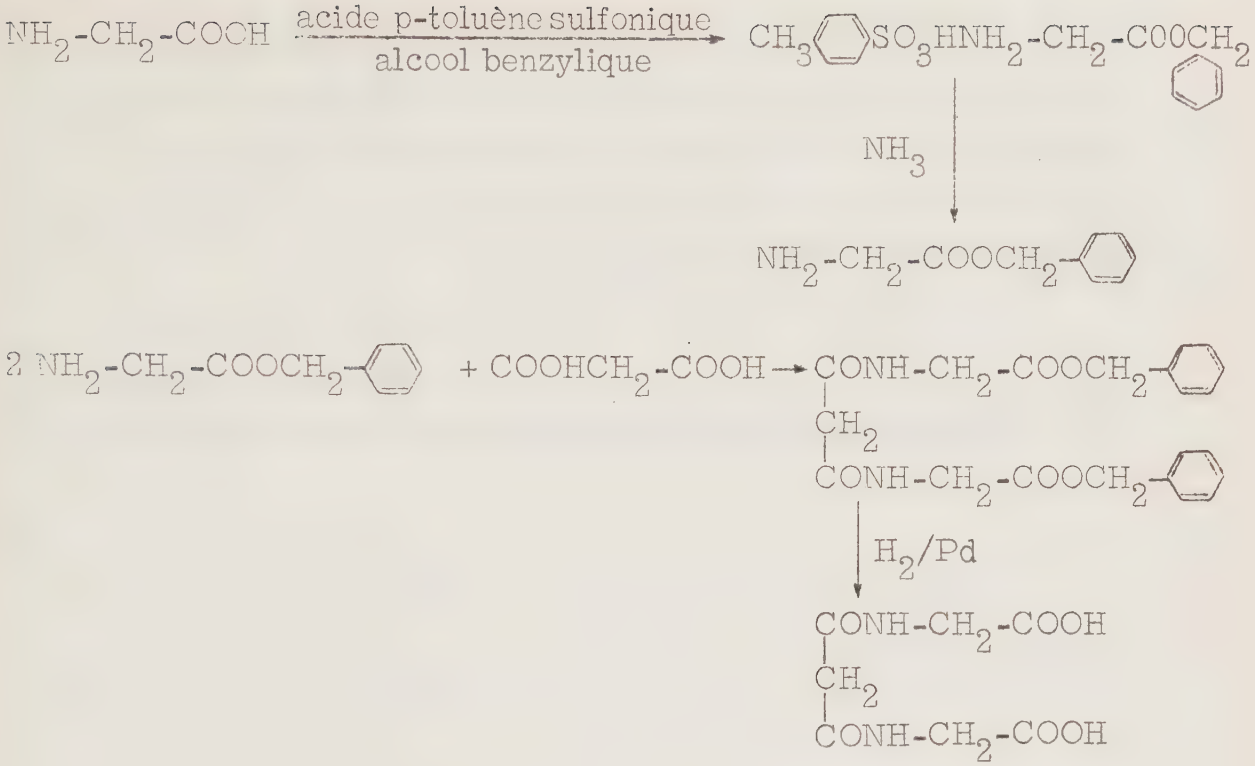
	trouvé % :	C 62,83	H 5,66	N 7,02
$C_{21}H_{22}O_6N_2$,	calculé % :	C 63,30	H 5,56	N 7,03

4. Hydrogénolyse (32,33).

Nous avons libéré les groupements carboxyliques par hydrogénation dans du méthanol en présence de 5% de palladium sur charbon. La durée de l'hydrogénolyse était de 6 à 8 heures. Au cours de l'hydrogénolyse, la diamide commence à précipiter. Ce précipité est dissous dans quelques millilitres d'eau distillée chaude. On élimine le catalyseur par filtration et on concentre la solution sous vide. Le produit est recristallisé dans de l'eau chaude avec quelques gouttes de méthanol. Les cristaux sont en forme de petites aiguilles et fondent avec décomposition à 231-238°.

Analyse élémentaire :

	trouvé % :	C 38,24	H 4,70	N 12,60
$C_7H_{10}O_6N_2$,	calculé % :	C 38,53	H 4,62	N 12,84



Nous avons constaté que ce produit ne réagit pas à la ninhydrine, qu'il donne une réaction du biuret positive et qu'après traitement dans l'acide chlorhydrique 6 N pendant 2 heures à 120°, il hydrolyse totalement. Lasubstance B (voir chapitre II), donne une réaction du biuret négative, et on obtient une hydrolyse partielle si on le traite dans les mêmes conditions que précédemment.

Résultats des titrages :

La courbe de titrage correspond à un produit possédant deux valences carboxyliques pour un poids moléculaire voisin de 220. Le titrage de ces carboxyles comporte un seul palier, ce qui indique des pK très voisins, différents d'une unité au plus. La moyenne de ces pK est à peu près 3,75. On peut donc considérer que le pK_1 est compris entre 3,2 et 3,7, et le pK_2 entre 3,8 et 4,2.

L'examen des courbes de titrage complexométriques

montre (en ce qui concerne le magnésium ou le zinc) que les constantes de stabilité des chélates formés sont du même ordre de grandeur que celles des chélates correspondants du glycocolle, c'est-à-dire incomparablement plus faibles que celles de l'aspergillomarasmine B ou de l'EDTA.

Il est intéressant de remarquer que, selon les travaux de Faust et Kleppel (34), le NN' adipoyl-bis(L-histidinamide) est un chélateur beaucoup plus fort vis-à-vis du Cu^{++} que la L-histidine.

° ° °

PARTIE BIOLOGIQUE

CHAPITRE IX

ASPERGILLOMARASMINES ET LYCOMARASMINES

La lycomarasmine est un produit isolé par Plattner et Clauson-Kaas (2,3) du milieu de culture d'un champignon phytopathogène, le Fusarium lycopersici (Sacc.). Au cours de l'isolement et de la purification de la lycomarasmine, ces mêms auteurs obtenaient, à partir des eaux mères, une autre substance, qu'ils ont appelée substance J. La lycomarasmine avait une activité flétrissante sur certaines plantes, entre autres sur les feuilles de tomates, tandis que la substance J était inactive.

En 1951, Boller a pu obtenir par voie chimique la substance J à partir de la lycomarasmine, en la chauffant en milieu acide, neutre ou alcalin (21,35). En 1954, Liechti a repris l'étude de la lycomarasmine (4). En voulant répéter les expériences de Boller et transformer la lycomarasmine en milieu alcalin en substance J, il a obtenu un nouveau produit qu'il a appelé acide lycomarasmique. Cet acide se transforme, en solution aqueuse et en milieu acide, en substance J; la transformation est accélérée à chaud. L'acide lycomarasmique s'est révélé comme une phytotoxine deux fois plus puissante que la lycomarasmine.

En étudiant les résultats publiés par ces auteurs concernant la lycomarasmine et ses dérivés, nous avons été surpris par

leur analogie avec les aspergillomarasmines. En plus de la comparaison des résultats déjà publiés avec les nôtres, nous avons pu procéder à des essais comparatifs, grâce à l'obligeance du Professeur E. Hardegger qui a bien voulu nous envoyer des échantillons de lycomarasmine et de substance J. Nous avons transformé la lycomarasmine en acide lycomarasmique pour pouvoir la comparer à l'aspergillomarasmine B.

Transformation de la lycomarasmine en acide lycomarasmique.

Nous avons modifié la méthode de Liechti (4). 100 mg de lycomarasmine ont été hydrolysés dans 3 ml de baryte 0,31 N, en tube scellé, à 90°, pendant 2 heures. Après hydrolyse on précipite le baryum à chaud avec une solution de H_2SO_4 1,92 N (pH final 1-2). On évacue le précipité par centrifugation. On vérifie l'élimination complète du baryum, en ajoutant une goutte de la solution d'acide sulfurique au surnageant. S'il n'y a plus de sulfate de baryum qui précipite, on augmente lentement le pH de la solution à l'aide de soude diluée (environ 0,01 N). En arrivant à pH 2,5, l'acide lycomarasmique commence à cristalliser rapidement. On met le tube à 0° pendant une demie heure environ, puis on filtre les cristaux. On obtient ainsi 44 mg de substance. Au surnageant on ajoute de l'éthanol à 95% et on remet le tube à 0°. Après 24 heures on filtre les cristaux formés. Le poids de la substance obtenue est de 24 mg.

Rendement : 68%. L'analyse élémentaire, les constantes physiques et chimiques, correspondent à ceux décrits par Liechti pour l'acide lycomarasmique.

Analyse élémentaire :

	trouvé % :	C 38,51	H 5,19	N 10,16
$C_9H_{14}O_8N_2$,	calculé % :	C 38,84	H 5,07	N 10,07

Comparaison des constantes physiques et chimiques (voir tableau 1).

La lycomarasmine, et ses dérivés comme les aspergillomarasmines, ne sont solubles que dans les acides ou dans les alcalis dilués, et sont instables en milieu même faiblement acide.

L'aspergillomarasmine A et la lycomarasmine, malgré certaines ressemblances (analyse élémentaire, pouvoir rotatoire, point de fusion) ne sont pas identiques. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence la glycine dans les produits d'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A, comme c'est le cas pour la lycomarasmine. Les résultats des dosages d'NH_2 selon Van Slyke ont toujours été positifs pour la substance A, négatifs pour la lycomarasmine.

L'aspergillomarasmine B est identique à l'acide lycomarasmique. Mais tandis que l'aspergillomarasmine B est une substance naturelle, isolée du milieu de culture de l'Aspergillus flavus oryzae, l'acide lycomarasmique a été obtenu jusqu'à présent uniquement par voie chimique à partir de la lycomarasmine.

L'analyse élémentaire, le pouvoir rotatoire, les pK et la courbe de titrage en présence de magnésium sont identiques pour les deux substances. Il n'y a pas d'abaissement de point de fusion en mélangeant les cristaux des deux produits. Les résultats des réactions à la ninhydrine, à l'hypoiodite de sodium, ceux du biuret ainsi que les R_F dans différents solvants de chromatographie sont également identiques. Leurs spectres infrarouges mesurés dans le nujol sont superposables (fig.3, p.32). L'acide lycoma-

TABLEAU 1

Comparaison des propriétés physiques et chimiques aspergillomarasmine B avec celles de la

	lycomarasmine	aspergillomarasmine A
F.	212-238°(décomp.)	225-236°(décomp.)
$[\alpha]_D$ dans un tampon pH 7	-48°	-48°
Formule brute	$C_9H_{15}O_7N_3$	$C_9H_{15}O_7N_3$ ou $C_{10}H_{17}O_8N_3$
Produits d'hydrolyse	acide aspartique glycocolle acide pyruvique	acide aspartique + "acide A"
Van Slyke	0	2 NH_2
O-(CH_3) C-(CH_3) N-(CH_3)	0	0
R_f (révélation à la ninhydrine) (1)	0,19	0,10
(2)	0,33	0,25
Activité biologique (3)	++	++

(1) solvant : pyridine-acide acétique-eau (50:35:15).
(2) solvant : méthanol-22% ammoniaque aqueux.
(3) flétrissement des feuilles de tomates, produit par une solution à 0,12% contenant 0,13% de $FeCl_3$.

TABLEAU 1

des aspergillomarasmines A et B et de l'anhydro-lycomarasmine et de ses dérivés.

acide lycomarasmique	aspergillo-marasmine B	Substance J	anhydro-aspergillo-marasmine B
220-230° ※	221-231° (décomp.)	273-276° 272-280° (décomp.)	270-292° (décomp.)
-21°	-20°	-110°	-103°
$C_9H_{14}O_8N_2$	$C_9H_{14}O_8N_2$	$C_9H_{12}O_7N_2$	$C_9H_{12}O_7N_2$
acide aspartique + glycocolle		acide aspartique + glycocolle	
0	0	0	0
0	0	0	0
0,16 -	0,16 -	0,28 0,35	0,28 0,35
++++	++++	0	0

※ Dans la thèse de Liechti (4), on trouve F. 190° pour l'acide lycomarasmique; ce chiffre est très probablement erroné.

rasmique et l'aspergillomarasmine B se transforment, en milieu acide ou par chauffage dans l'eau, en substance J et anhydro-aspergillomarasmine B respectivement. L'hydrolyse des deux substances est relativement facile au début, mais il est très difficile de les hydrolyser complètement. Les produits d'hydrolyse des deux substances sont l'acide aspartique et le glycocolle.

La substance J est identique à l'anhydro-aspergillomarasmine B. L'analyse élémentaire, les points de fusion et les résultats des titrages potentiométriques sont identiques. Les pouvoirs rotatoires des deux produits sont voisins dans le tampon phosphate à pH 7. Les spectres infrarouges comparatifs, faits en suspension dans le nujol (voir fig. 10, p.48) sont superposables. Les deux substances donnent à froid une coloration jaune à la ninhydrine, les R_F, dans différents systèmes de solvants, ainsi que les produits fournis par hydrolyse, sont identiques.

Compte tenu de ces résultats, nous avons essayé l'action flétrissante de nos substances sur les feuilles des tomates.

Concernant l'action phytopathogène des champignons parasites Fusarium lycopersici, il existe plusieurs théories (36,37).

Le champignon exerce son action par perturbation de la circulation d'eau dans la plante, et c'est la sécrétion d'une toxine (marasmine selon la terminologie de Gäumann (38)) qui est responsable de cette activité.

Nous avons exécuté le test de flétrissement avec des feuilles de tomates selon la technique décrite par Boller d'après Gäumann (39) et Woolley (40). Les aspergillomarasmines et la lycomarasmine ont été dissous à l'aide d'une solution de soude 0,1 N. Le pH final de la solution était 7. Toutes les solutions ont été faites avec de l'eau d'Evian.

TABLEAUX 2 ET 3

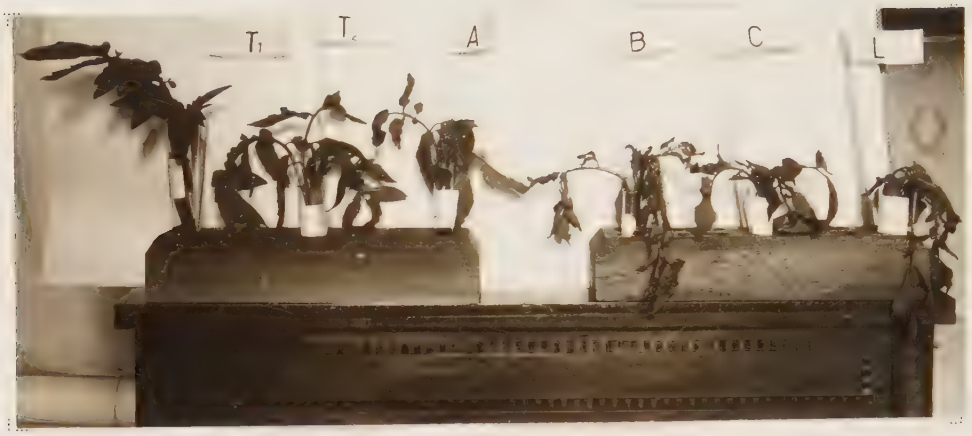
Activités de la lycomarasmine et des aspergillomarasmines sur les feuilles de tomates.

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Eau d'Evian 10 ml			partout			
Sol. de $FeCl_3$ 0,3 mg	x					
Lycomarasmine 2 mg	x	x		x	x	x
Substance A 2 mg	x	x	x		x	x
Substance B 2 mg	x	x	x	x		x
Anhydro-asperg. B 2 mg	x	x	x	x	x	
Résultats après 24 heures	0	0	+++	+++	++++	0

Un autre essai a donné les résultats suivants :

Tube n°	1	2	3	4	5*	6**	7	8*	9*	10*
Eau d'Evian 10ml					partout					
Sol. de $FeCl_3$ 0,3 mg	x			x			x			
Sol. de $MgCl_2$ 0,3 mg	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Lycomarasmine 2 mg	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Substance A 2 mg	x	x	x	x	x	x	x		x	x
Substance B 2 mg	x	x	x					x	x	x

La photo ci-dessous montre les résultats des deux expériences.



Effet de la lycomarasmine et des aspergillomarasmines sur les feuilles de tomates.

Nous avons observé les symptômes suivants : 4 à 5 heures après le début d'expérience, les feuilles commencent à flétrir, il y a une consommation d'eau très intense, et en 24 à 48 heures, les feuilles sont complètement desséchées. Ces observations sont en accord avec celles publiées sur l'effet de la lycomarasmine (39,41).

Les résultats obtenus par Mme S. Naef-Roth sont les suivants :

Lycomarasmine, dose minima .. .. 190 mg/kg
Aspergillomarasmine A, dose minima .. .. 230 mg/kg
Aspergillomarasmine B, dose minima .. .. 125 mg/kg
Anhydro-aspergillomarasmine B, dose min. 500 mg/kg

Dose minima = quantité de toxine nécessaire, à une concentration déterminée, pour provoquer, dans des conditions bien précises, des dommages irréversibles sur un kg de matière vivante, à la suite des symptômes de flétrissement également ir-

réversible.

Il est peu probable que l'activité flétrissante de ces substances soit en relation avec leur activité complexante. Nous avons essayé l'action de l'EDTA sur les feuilles de tomates et nous l'avons trouvé inactif.

L'activité la plus intense a été observée dans les essais effectués en présence de chlorure ferrique. Les essais effectués en présence de chlorure de magnésium, ou avec les substances seules, ont conduit à une activité plus faible.

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment signalés par Boller (21). Les raisons précises de l'accroissement de l'activité par le fer ne sont pas connues. Le fait qu'on puisse isoler des phytotoxines du milieu de culture d'un champignon considéré comme non phytopathogène, est intéressant.

° ° °

CHAPITRE X

EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LES REACTIONS CATALYSEES PAR LE Cu^{++}

Les travaux de M. L.Roux de la S.E.A.B. ont montré que l'aspergillomarasmine B complexait certains métaux.

L'on sait d'autre part que les chélates métalliques ont parfois des propriétés catalytiques intéressantes. Nous avons donc pensé que certains systèmes à catalyseur métallique pouvaient être inhibés par la substance B, tandis que d'autres pouvaient être activés.

On sait depuis les travaux classiques de Szent-Györgyi(42), que l'acide ascorbique joue un rôle de transporteur d'électrons et intervient comme cofacteur dans le métabolisme cellulaire, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Les travaux de Staudinger et coll. (43,44,45) et de Kern et Racker (46) ont montré que le radical libre, acide mono-deshydro-ascorbique, est un transporteur d'électrons spécifique entre le DPN et certaines substances oxydables au niveau des surrénales. Ce même radical semble intervenir dans la photosynthèse(47). L'oxydation ménagée de cette vitamine est donc nécessaire pour son activité métabolique.

Les ions Cu^{++} catalysent l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique. Nous voulions voir si l'aspergillomarasmine B, en complexant le Cu^{++}, augmentait ou diminuait l'activité catalytique.

D'autre part nous avons consacré une série d'expériences aux substances sulfhydrilées. Ces substances, dont la plus connue

est la cystéine, ont une très grande importance biochimique, et ceci à trois titres au moins :

1) Ce sont des métabolites que l'on rencontre au cours de la dégradation et de la synthèse des amino-acides soufrés, comme la cystéine, la méthionine, la taurine (48, 49).
2) La fonction thiol représente ou fait partie du groupement actif de nombreux enzymes et de plusieurs coenzymes (coenzyme A, aneurine)(50).
3) La fonction thiol cystéique, et les ponts disulfures, jouent un rôle important dans le maintien de la structure native des protéines. Leur oxydation constitue souvent une étape irréversible de leur dénaturation (51, 52).

La plupart des réactions concernant ces fonctions thiol sont des oxydo-réductions (p. ex. l'oxydation de la cystéine en cystine, formation d'un pont disulfure entre deux chaînes peptidiques).

Ces réactions d'oxydation sont catalysées par les métaux lourds, comme le Fe^{++}, Cu^{++}, Co^{+++}, etc. (53, 54, 55, 56, 57).

Les ions Cu^{++} et les hémoprotéines sont d'importants catalyseurs d'oxydation en biochimie.

Nous avons suivi l'oxydation des fonctions thiol de molécules simples (cystéine) et plus complexes (sérumalbumine et caséine) en nous servant de Cu^{++} comme catalyseur.

Méthode d'étude.

Les réactions de réduction de Cu^{++} en Cu^{+} peuvent être étudiées grâce à l'emploi d'un complexant spécifique des ions cuivreux, la 2-2' biquinoline. On obtient en milieu acide ou organique un complexe rouge avec le Cu^{+}, permettant ainsi de suivre la vitesse de la réduction.

Le protocole de ces expériences est le suivant : à 2 ml d'acide acétique glacial contenant 1 mg de 2-2' biquinoline on ajoute 0,2 ml de $CuCl_2$ 0,001 M (0,2 µM), le réducteur dissous dans 0,2 ml d'eau et des concentrations différentes de l'inhibiteur. Le volume final est amené à 3,4 ml avec de l'eau bidistillée. On suit la formation du complexe coloré Cu^+-biquinoline à 540 mµ à 20°C (58, 59).

Il faut remarquer toutefois que les fonctions thiol ne sont pas les seuls groupements réducteurs dans les protéines. Nous avons donc effectué des études avec une protéine riche en fonctions disulfures et thiol, comme la sérumalbumine de cheval (trois fois recristallisée selon la méthode de Macheboeuf (52)) et avec un autre n'en contenant que très peu, comme la caséine (produit de Merck selon Hammersten).

Pour vérifier si l'oxydation de la cystéine s'arrête bien au stade disulfure, il était important d'effectuer des contrôles. Les étapes ultérieures, conduisant aux sulfites, sulfates et à la séparation du soufre de la molécule, ne relèvent pas nécessairement de la catalyse métallique. Ce contrôle fut effectué par polarographie. On sait notamment que la vague polarographique de la cystéine, obtenue en milieu ammoniacal en présence d'ions cobalteux, est une vague catalytique (60). La hauteur de la vague est la même, rapportée à un atome-gramme de soufre, pour la cystéine et pour la cystine (61).

Pour étudier l'effet de l'aspergillomarasmine B sur la vitesse d'oxydation aérobie de l'acide ascorbique, nous avons choisi la méthode spectrophotométrique de Racker (62). On introduit dans une cuve en silice de 10 mm d'épaisseur, 2 ml d'un tampon à pH déterminé, 0,35 µM d'acide ascorbique et, au temps zéro, 0,02 µM de Cu^{++}, le volume final étant de 3,37 ml. On

mesure la vitesse de décroissance de la densité optique à 265 mμ (maximum d'absorption de l'acide ascorbique dans l'U.V.). Elle est proportionnelle à la réaction globale qui est de type pseudo-monomoléculaire.

Nous avons effectué des expériences analogues avec l'acide éthylène diamine tétraacétique (versène) à la place de la substance B, en vue de comparer l'activité des deux produits.

Résultats obtenus.

1. Action de l'aspergillomarasmine B sur la réduction de Cu^{++} par l'acide ascorbique.

La figure 13 (p. 70) représente les variations de l'action inhibitrice de la substance B et du versène sur la réduction du Cu^{++} par l'acide ascorbique. L'intensité de l'action inhibitrice augmente avec le rapport molaire substance B/atome-gramme de Cu^{++} et diminue avec le temps, ceci pour deux raisons; 1) il se produit une dissociation du complexe substance B/Cu^{++} et 2) une hydrolyse acide du produit. Le versène se comporte qualitativement de la même façon, mais pour le même rapport molaire l'inhibition est plus importante et plus durable que celle produite par l'aspergillomarasmine B.

Sur la figure 14 (p. 71) nous indiquons l'importance de la réduction du Cu^{++} par l'acide ascorbique en fonction du rapport moles d'acide ascorbique/atomes gramme de Cu^{++} avec ou sans aspergillomarasmine B (ce dernier: 2 μM; rapport substance B/Cu^{++}: 10) après 30 minutes d'incubation. On peut constater qu'en l'absence de la substance B, la réduction du Cu^{++} est de 85% pour un rapport moles d'acide ascorbique atomes grammes de

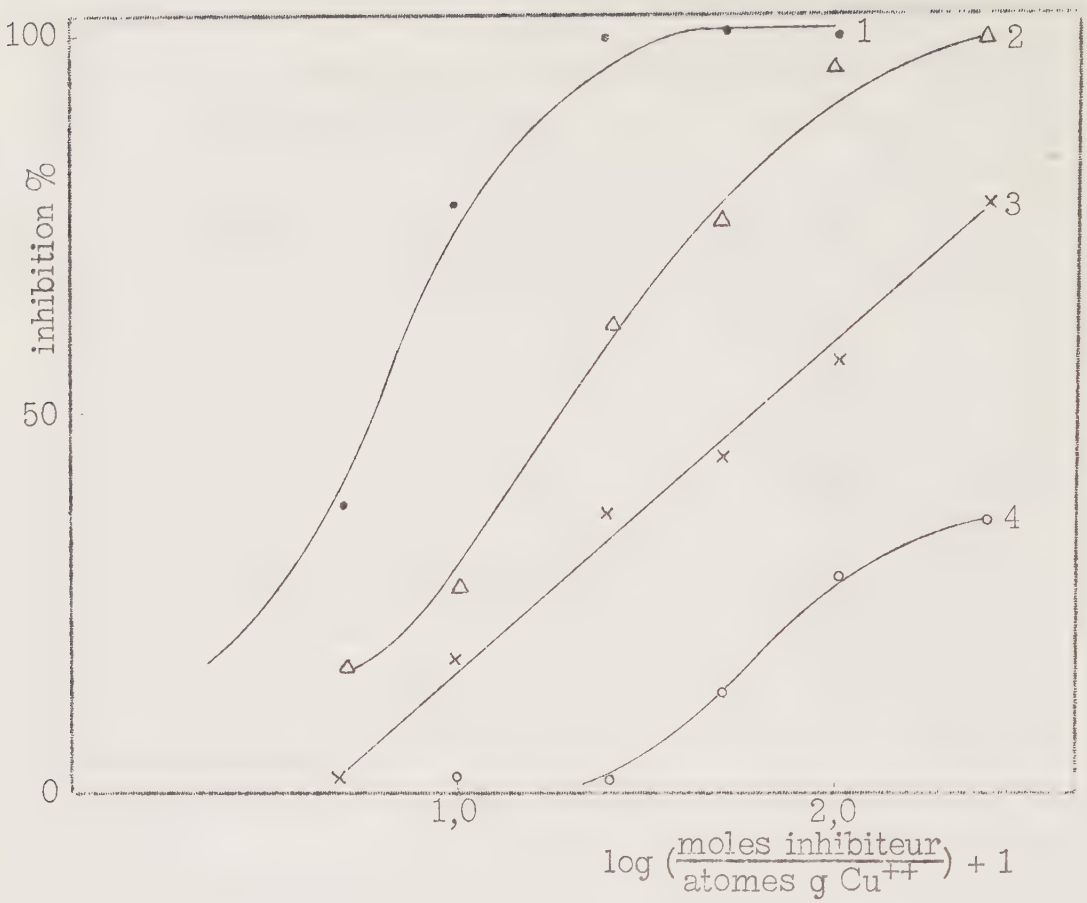


FIGURE 13

Inhibition par l'aspergillomarasmine B et par l'EDTA de la réduction du Cu^{++} par l'acide ascorbique.

Courbe 1 : EDTA après 30 minutes d'incubation
2 : EDTA après 24 heures d'incubation
3 : Substance B après 30 minutes d'incubation
4 : Substance B après 24 heures d'incubation
Acide ascorbique : 0,002 µM.

Cu^{++} = 0,5 (courbe 1). En présence de l'aspergillomarasmine B, la réduction est fortement inhibée pour des concentrations faibles de l'acide ascorbique (courbes 2 et 3). La courbe 4 représente le pourcentage de l'inhibition par la substance B, mesurée au bout de 30 minutes d'incubation. On voit que cette inhibition est de

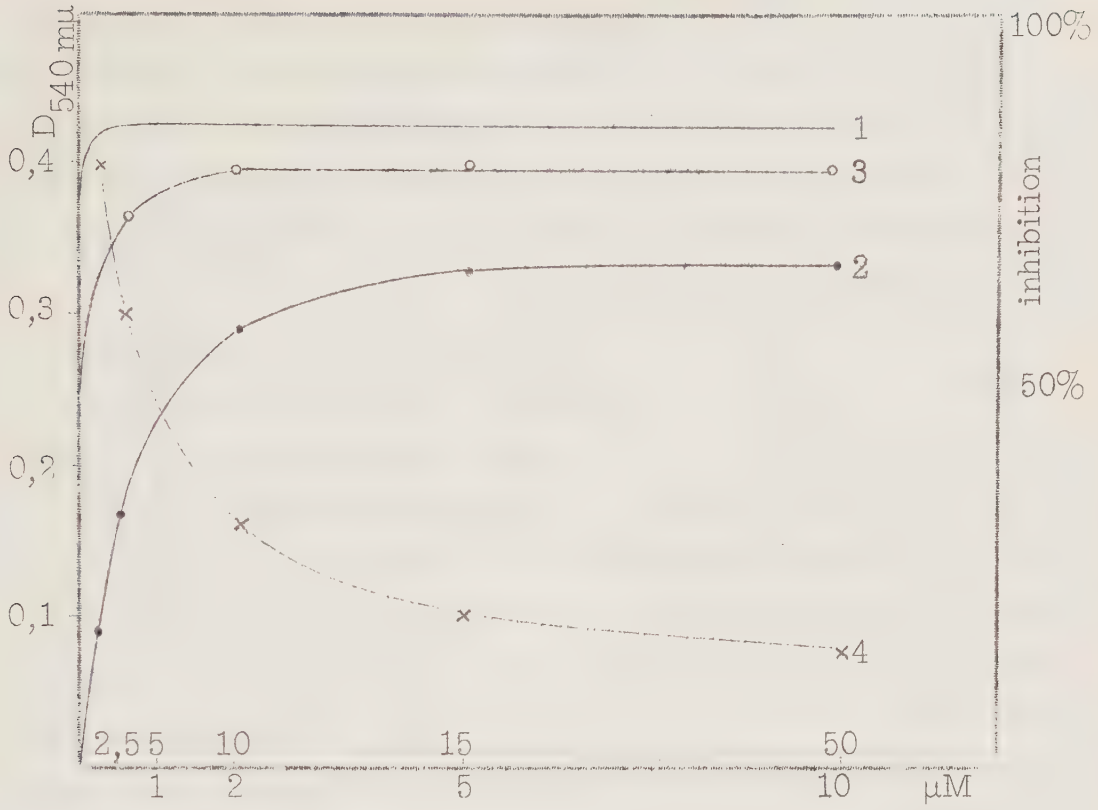


FIGURE 14

Inhibition par 2 µM d'aspergillomarasmine B de la réduction de 0,2 µM de Cu^{++} par l'acide ascorbique en fonction de la concentration de ce dernier.

Abscisses : (en haut) $\frac{\text{Moles d'acide ascorbique}}{\text{Atomes g de } Cu^{++}}$

(en bas) µM d'acide ascorbique

Ordonnées : (à gauche) densité optique à 540 mµ

(à droite) inhibition %

Courbe 1 : Réduction sans substance B.

2 : Réduction en présence de la substance B après 30 minutes d'incubation.

3 : Réduction en présence de la substance B après 24 heures d'incubation.

4 : Inhibition de la réduction après 30 minutes d'incubation.

80 % pour un rapport molaire acide ascorbique/Cu^{++}/substance B = 1/1/10. Là encore, la diminution de l'inhibition avec le temps peut être attribuée à la dissociation du complexe Cu^{++}/aspergillomarasmine B. Plus il y a d'acide ascorbique, plus cette dissociation progresse rapidement, étant donné la compétition pour le Cu^{++} entre cet acide et la substance B.

En conclusion nous pouvons donc dire que la substance B, en vertu de son pouvoir complexant, inhibe la réduction du Cu^{++} par l'acide ascorbique, et ceci à des concentrations très faibles environ 1 à 3.10^{-3} Moles g). En milieu acide (pH<4), le complexe Cu^{++}/aspergillomarasmine B se dissocie lentement, il y a début d'hydrolyse avec formation d'anhydro-aspergillomarasmine B, et ainsi l'inhibition diminue. Cette dissociation augmente avec la concentration de l'acide ascorbique. Le versène se comporte de la même façon mais il inhibe plus fortement à concentration molaire égale, et l'inhibition diminue plus lentement avec le temps.

2. Action de l'aspergillomarasmine B sur l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique en présence de Cu^{++}.

Résultats : La figure 15 (p. 73) montre la cinétique de l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique mesurée par la décroissance de son absorption dans l'ultraviolet à 265 mμ. Nous avons porté en abscisses le temps en minutes et en ordonnées le logarithme de la densité optique. On obtient ainsi des droites dont la pente permet de calculer la constante de vitesse de la réaction pseudomonomoléculaire (km). La courbe 1 montre la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique en absence de la substance B (km = 0,123 min^{-1}). La courbe 2 montre l'évolution de la réaction en présence de 0,01 μM d'aspergillomarasmine B. On note un ralen-

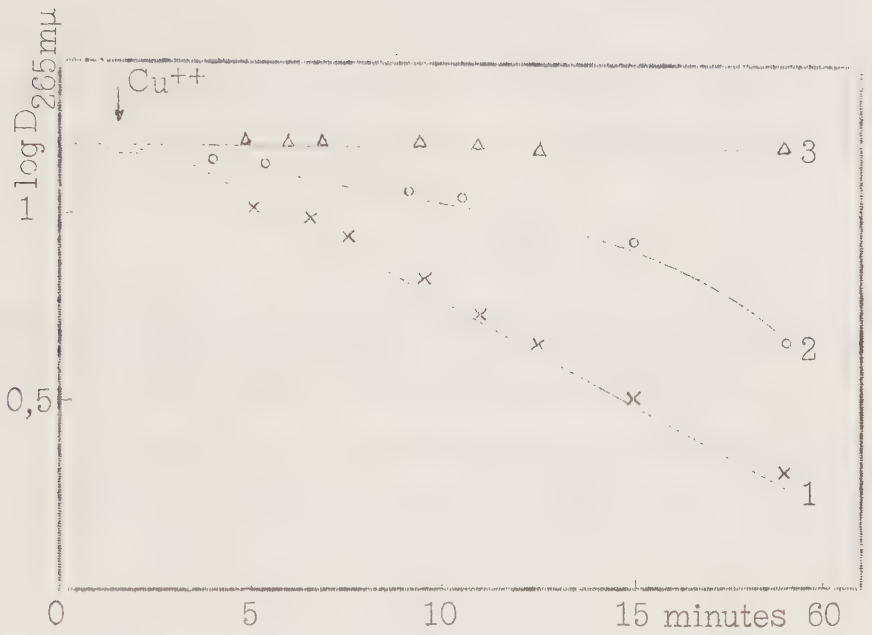


FIGURE 15

Cinétique de l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique mesurée par la décroissance de son absorption dans l'ultraviolet.

Abscisses : temps en minutes.
Ordonnées : logarithme de densité optique à 265 mμ.

Courbe 1. Acide ascorbique sans substance B.
Courbe 2. Acide ascorbique en présence de 0,01 μM d'aspergillomarasmine B.
Courbe 3. Acide ascorbique en présence de 0,02 μM d'aspergillomarasmine B.
Acide ascorbique : 0,35 μM; $CuCl_2$: 0,02 μM.

tissement très net de la réaction, suivi d'une accélération au delà de 10 minutes. Avec 0,02 µM de substance B (courbe 3), l'inhibition est totale et durable (mesurée jusqu'à 60 minutes environ).

Le tableau 4 montre les constantes pseudomonomoléculaires et le degré d'inhibition pour différentes concentrations d'aspergillomarasmine B.

TABLEAU 4

Inhibition de l'oxydation cuprique aérobie de l'acide ascorbique à pH 7 en fonction de la quantité d'aspergillomarasmine B ajouté. Acide ascorbique 0,35 µM, $CuCl_2$ 0,02 µM.

µM substance B ajouté	rapport substance B/Cu^{++}	km/min^{-1}	inhibition %
-	0	0,123	0
0,005	0,25	0,084	31,5
0,01	0,50	0,039	68,2
0,02	1,0	0,004	97

L'étude du pouvoir inhibiteur de la substance B en fonction du pH du mélange est rendue difficile du fait que la plupart des tampons sont eux-mêmes des complexants du cuivre.

Ainsi, par exemple, le tampon de McIlvaine au citrate-phosphate, inhibe très fortement l'oxydation de l'acide ascorbique entre pH 2 et pH 7 et l'oxydation ne devient appréciable qu'après 21 heures d'incubation. En tampon acétate pH 4,4 (0,1 M), l'oxydation de l'acide ascorbique est très lente (fig. 16, courbe 1, p. 75). En présence de 0,02 µM de substance B la vitesse initiale de l'oxydation n'est pas modifiée, mais au bout de 4 jours on retrouve

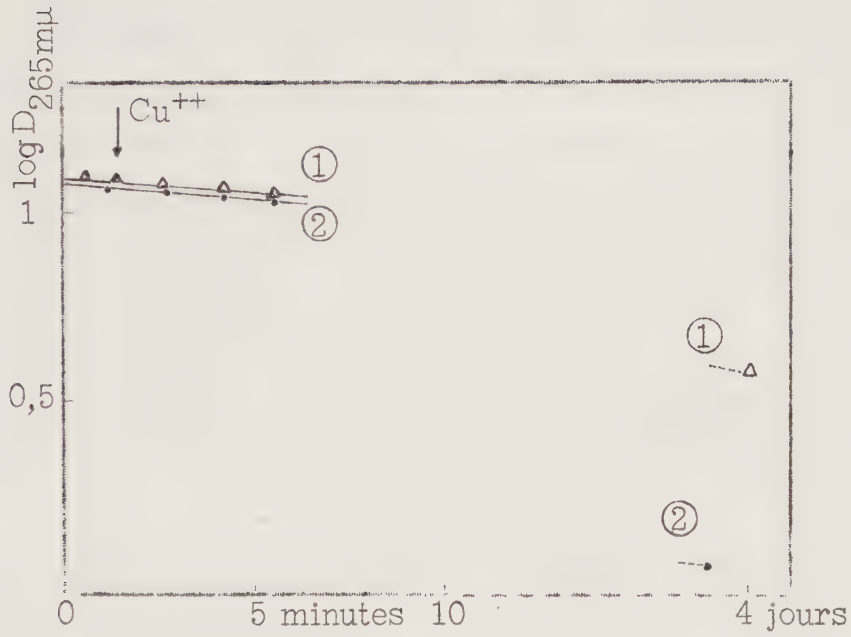


FIGURE 16

Cinétique de l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique, mesurée par la décroissance de son absorption dans l'ultraviolet.

Abscisses : temps en minutes.
Ordonnées : logarithme de la densité optique à 265 mμ.

Courbe 1. 0,35 μM d'acide ascorbique dans tampon acétate à pH 4,4, avec 0,02 μM d'aspergillomarasmine B.
Courbe 2. 0,35 μM d'acide ascorbique dans tampon acétate à pH 4,4 , sans substance B.

la moitié environ de l'acide ascorbique initial; tandis que, sans aspergillomarasmine B, l'oxydation est totale (courbe 2). Après 2 jours d'incubation à 20°C dans un tampon trihydroxyméthyl-aminométhane (tris) à pH 9, un tiers environ de l'acide ascorbique est oxydé en présence de 0,02 µM de substance B (75% de protection)(fig. 17). L'inhibition de l'oxydation de la vitamine C par la substance B peut être constatée jusqu'à pH 12. Bien qu'elle ne soit que de 30% environ pour 0,02 µM de substance B à pH 9,7, à pH 11,8 dans un tampon hydroxyde-chlorure de sodium, la même concentration d'aspergillomarasmine B donne toujours 23% d'inhibition.

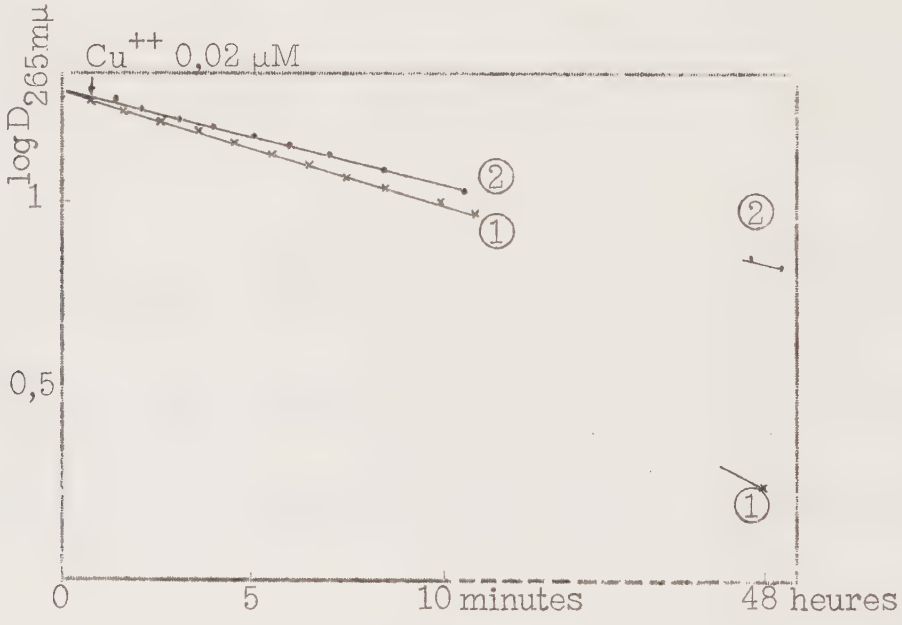


FIGURE 17

Cinétique de l'oxydation aérobie de l'acide ascorbique mesurée par la décroissance de son absorption dans l'ultraviolet.

Abscisses : temps.
Ordonnées : logarithme de la densité optique à 265 mµ.

Courbe 1 : 0,35 µM d'acide ascorbique dans tampon "tris" à pH 9.
Courbe 2 : 0,35 µM d'acide ascorbique dans tampon "tris" à pH 9 + 0,02 µM de substance B.

L'aspergillomarasmine B inhibe l'oxydation cuprique de l'acide ascorbique. L'inhibition très forte au début diminue avec le temps, cette baisse de protection étant d'autant plus faible que la concentration de la substance B est plus forte. Pour un rapport de 5 à 10 moles de substance B par atome gramme de Cu^{++}, l'inhibition est très importante, même au bout de plusieurs jours, les mélanges étant laissés à l'air libre à 20°C. L'inhibition par la substance B a pu être mise en évidence entre pH 4 et 12. On constate une inhibition de 100 % de la vitesse initiale de l'oxydation pour un rapport de 1 mole d'aspergillomarasmine B par atome gramme de Cu^{++}.

3. Action de l'aspergillomarasmine B sur la réduction du Cu^{++} par la cystéine.

En étudiant la réduction du Cu^{++} par la cystéine et l'inhibition de cette réduction par la substance B, nous avons constaté le même phénomène que pour l'oxydation de l'acide ascorbique, à la différence près, que l'inhibition est plus forte et plus durable avec la cystéine comme substrat oxydable.

La figure 18 (p. 78) représente la réduction du Cu^{++} par la cystéine en présence de 10 µM de la substance B en fonction du rapport cystéine/Cu^{++} à des intervalles de temps différents. Il ressort de cette expérience qu'au bout de trois jours d'incubation à température ambiante, l'inhibition varie encore entre 100 et 65 %. Même au bout de 5 jours on constate une inhibition très nette (de l'ordre de 30 %), tandis qu'après 7 jours l'inhibition est très faible ou nulle pour de fortes quantités de cystéine. Elle est toujours très sensible pour les rapports SH/Cu^{++} inférieurs à 2,5 (de l'ordre de 30 à 45 %).

FIGURE 18

Réduction du Cu^{++} par la cystéine en absence et en présence de 10 µM d'aspergillomarasmine B.

Abscisses : rapport cystéine µM/atomes g de Cu^{++}
Ordonnées : % Cu^{++} réduit en Cu^{+}.

Courbe 1 : cystéine sans substance B.
2 : cystéine + 10 µM de substance B après 7 jours d'incub.
3 : cystéine + 10 µM de substance B après 5 jours d'incub.
4 : cystéine + 10 µM de substance B après 4 jours d'incub.
5 : cystéine + 10 µM de substance B après 3 jours d'incub.

La figure 19 (ci-contre) montre la cinétique de la baisse de l'inhibition pour des rapports substance B/cystéine différents.

Ces données permettent de faire des hypothèses sur la nature de la réaction responsable de la baisse de l'inhibition.

Notamment, si l'on admet la série des réactions suivantes:

1. $R - SH + Cu^{++} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R - SCu^{+} + H^{+}$

2. $2\,R - SCu^{+} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} R - S - S - R + 2\,Cu^{+}$

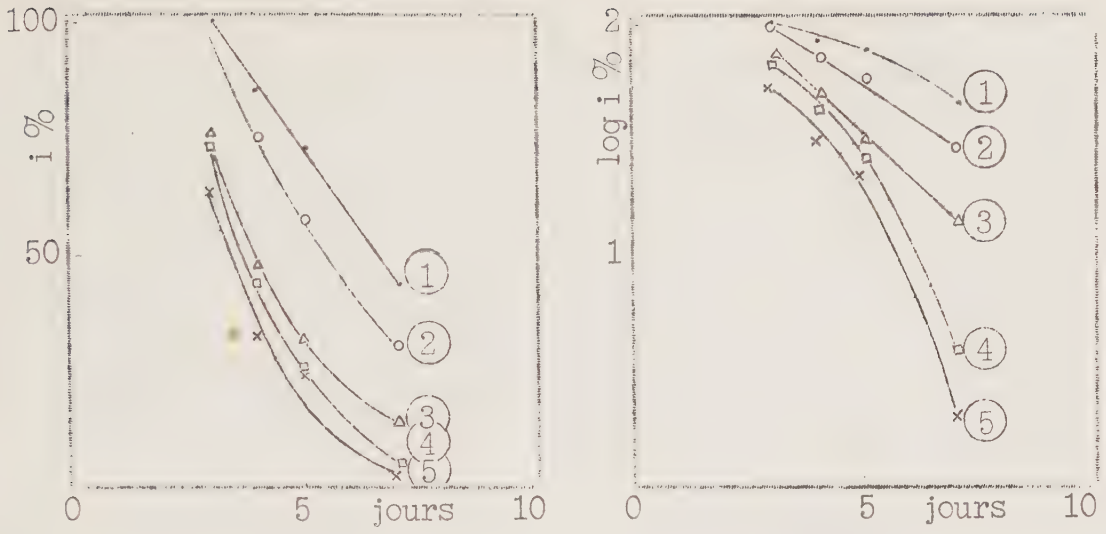


FIGURE 19

Cinétique de la baisse de l'inhibition de l'oxydation de la cystéine en présence de la substance B.

a

Abscisses : temps d'incubation, jours.
Ordonnées: inhibition en %.

b

Abscisses : temps d'incubation, jours.
Ordonnées: logarithme de l'inhib.

Courbe 1 : rapport $\frac{\text{substance B } \mu M}{\mu MSH} = 100$
2 : id. = 50
3 : id. = 20
4 : id. = 10
5 : id. = 5

3. $B + Cu^{++} \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} (BCu^{++})$

4. $Q + Cu^{+} \xrightarrow{k_4} (QCu^{+})$

5. $Cu^{+} + 1/2\ O_2 + H^{+} \xrightarrow{k_5} Cu^{++} + 1/2\ H_2O$

R - SH représente la cystéine, B l'aspergillomarasmine B,

Q la biquinoline, (QCu^+) le complexe coloré. Les réactions 1 et 2 montrent le mécanisme de l'oxydation de la cystéine en cystine. La réaction 3 montre la formation du complexe substance B-Cu^{++} responsable de l'inhibition. La réaction 4 conduit à la formation du complexe coloré Cu^+-biquinoline. En absence de biquinoline, les ions Cu^+ se réoxydent et continuent à catalyser la réaction (réaction 5). Le degré d'inhibition est défini par le rapport des constantes d'équilibres des réactions 1 et 3 :

$$6. \quad K_R = \frac{(R\text{-}SH).(Cu^{++})}{(R\text{-}SCu^+).(H^+)}$$

$$7. \quad K_B = \frac{(B).(Cu^{++})}{(BCu^{++})}$$

Mais en réalité on n'atteint pas d'équilibre dans la réaction, car elle est continuellement déplacée vers la réduction du Cu^{++} du fait de l'extrême affinité du Cu^+ pour la biquinoline (réaction 4).

Ainsi la vitesse avec laquelle l'inhibition diminuera dépend de la constante de vitesse de dissociation du complexe (BCu^{++}) (k_{-3}) dans la réaction 3. Nous admettons les inégalités suivantes :

$$k_1 \gg k_{-3} \quad \text{et} \quad k_4 > k_5 \quad \text{et} \quad k_3.$$

Le Cu^{++} dissocié du complexe substance B-Cu^{++} serait accessible pour l'oxydation de la cystéine, tandis que le cuivre réduit dans la réaction 2 n'avait pas le temps de se réoxyder pour se recombiner avec la substance B. Dans ces conditions la baisse de l'inhibition serait limitée par la réaction de dissociation :

$$8. \quad (BCu^{++}) \xrightarrow{k_{-3}} B + Cu^{++}$$

et devrait suivre une cinétique pseudomonomoléculaire. Ceci est

confirmé par la figure 19/b qui montre que dans les premiers cinq jours au moins la baisse de l'inhibition est en effet semilogarithmique (p.79).

La décroissance linéaire de la constante de vitesse pseudomonomoléculaire (k_{-3}) en fonction de l'augmentation du rapport µM substance B/µM cystéine, confirme l'hypothèse concernant la compétition entre cystéine et substance B pour le Cu^{++} libéré (fig.20).

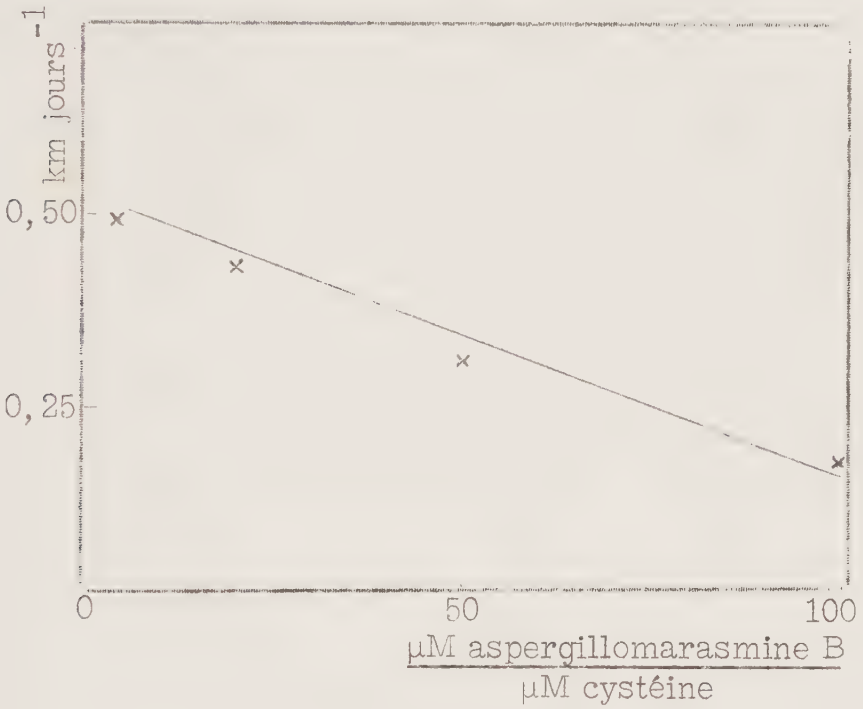


FIGURE 20

Décroissance linéaire de la constante de vitesse pseudomonomoléculaire de la dissociation du complexe substance B-Cu^{++} en fonction du rapport µM substance B/µM cystéine.

La dissociation du complexe (BCu^{++}) suit donc une cinétique de premier ordre par rapport au complexe et par rapport à la cystéine libre :

9. $k_{-3} = a - b\,(R\text{-}SH)$ et

10. $\dfrac{-d(BCu^{++})}{dt} = k_{-3}\,(BCu^{++})\,(R\text{-}SH)$

On peut évaluer a et b d'après les données de la figure 19/b (p.79) :

$a = 0,55$ jour^{-1} $\qquad b = 0,0042 \dfrac{\text{jour}^{-1}}{\mu M \text{ subst. B}/\mu M \text{ cystéine}}$

Cette équation permet de calculer l'excès de la substance B que l'on doit ajouter à une solution de cystéine pour en ralentir l'oxydation à une vitesse donnée en présence d'une quantité définie de Cu^{++}.

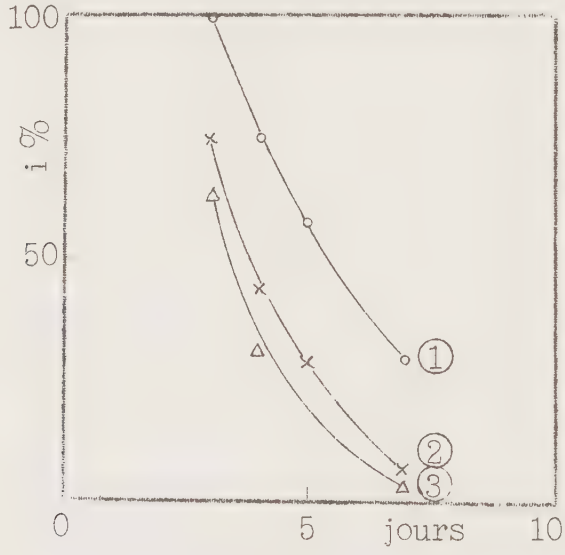


FIGURE 21

Baisse de l'inhibition de l'oxydation de la cystéine par la substance B en fonction du temps pour différents rapports cystéine/Cu^{++}.

1 cystéine/Cu^{++} = 1
2 cystéine/Cu^{++} = 5
3 cystéine/Cu^{++} = 10

Sur la figure 21 est schématisée la diminution de l'inhibition de l'oxydation de la cystéine en fonction du temps pour différents rapports cystéine/Cu^{++}. Des considérations analogues s'appliquent aussi bien à cette relation qu'à celle représentée sur la figure 19. La baisse de l'inhibition, c.a.d. la dissociation du complexe substance B-Cu^{++}, augmente légèrement avec l'augmentation du rapport cystéine/Cu^{++}.

Cette faible augmentation est en accord avec le fait que la cystéine n'influence pas directement la dissociation du complexe (BCu^{++}), elle entre seulement en compétition avec l'aspergillomarasmine B pour le Cu^{++} dissocié.

Les polarogrammes de la figure 22 montrent que la hauteur

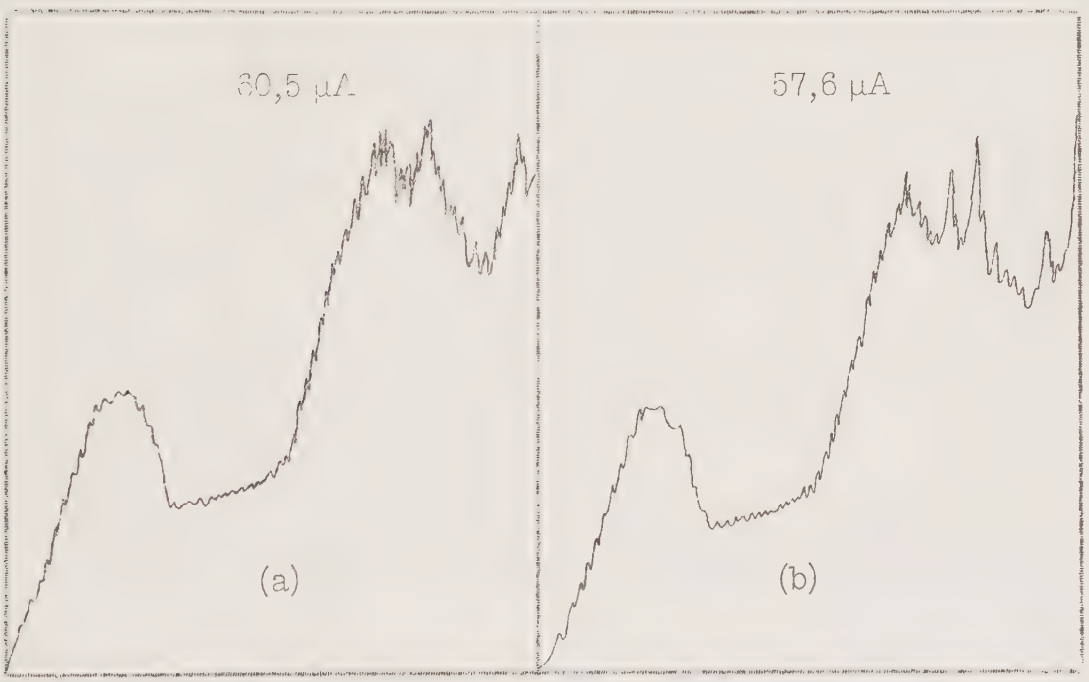


FIGURE 22

Polarogrammes du mélange de réaction contenant la cystéine et le Cu^{++}. (a) avant la réaction, (b) après l'oxydation. La hauteur des deux vagues catalytiques est identique aux erreurs d'expériences près, montrant que l'oxydation s'arrête au stade cystine.

de la vague catalytique de la cystéine ne change pas au cours de la réaction; nos études ont donc bien porté sur les réactions (1 - 7) à l'exclusion de réactions parasites.

4. Influence de l'aspergillomarasmine B sur la réduction du Cu^{++} par les protéines.

Par la suite nous voulions étendre ces recherches sur les groupements thiols des protéines. Nous avons choisi la sérum-albumine de cheval cristallisée qui contient à l'état natif environ 0,7 moles de SH libres par molécule : (P.M.: 65 000) après dénaturation ménagée on trouve 1 mole (63, 64). En milieu acide et alcalin des ponts S-S sont scindés selon la réaction :

$$R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + HOH = RSH + RSOH \quad (52).$$

Ainsi, en milieu acide et alcalin, la protéine acuiert un pouvoir réducteur considérable et s'oxyde rapidement à l'air. Cette oxydation est catalysée dans certaines conditions par le Cu^{++} (57). Le Cu^{++} a une très grande affinité pour la sérumalbumine, qui peut fixer, selon Klotz (65), au moins 16 atomes par molécule. L'énergie de la liaison va en décroissant du 1-er au 16ème et Kolthoff a pu montrer récemment (66) que le premier atome est attaché d'une façon très spéciale sur un groupement fonctionnel de la molécule, probablement identique à un résidu d'imidazole.

La réduction du Cu^{++} par les protéines en milieu alcalin est probablement due aux seules fonctions thiol (52). En milieu acide et neutre, en dehors des groupements sulfhydriles, d'autres fonctions interviennent (59).

La caséine, pauvre en cystéine, réduit le cuivre en pré-

sence d'acide acétique, aussi bien que la sérumalbumine riche en cystéine. Nous avons étudié l'influence de la substance B sur la réduction du Cu^{++} par ces deux protéines afin de connaître l'effet de la nature de la fonction réductrice sur l'inhibition.

Les tableaux 5 et 6 donnent les inhibitions obtenues à des intervalles de temps différents pour la sérumalbumine et la caséine.

TABLEAU 5

Inhibition en % de la réduction du Cu^{++} (0,2 µM) par la sérumalbumine de cheval en présence de la substance B et de versène.

Temps d'incubation	µM substance B / µM sérumalbumine				µM versène / µM sérumalbumine	
	158,5	79,5	31,7	15,85	31,7	15,8
		inhibition %			inhibition %	
3 heures	100	100	100	100	100	100
2 jours	100	100	100	100	100	100
6 jours	44,5	43,1	44,4	39	100	100
9 jours	44,3	43	38,2	32,3	100	100
13 jours	30	28	19	7,7	100	100

pH = 1,95 - 2,1

L'ensemble de ces résultats s'apparente à ceux obtenus avec la cystéine comme réducteur. L'inhibition est très forte, le plus souvent de 100% les 2-3 premiers jours, et diminue ensuite pour atteindre les valeurs des contrôles sans substance B au bout de 13 jours environ.

L'acide éthylène diamine tétraacétique, par contre, donne, dans les mêmes rapports molaires, une inhibition totale et stable.

TABLEAU 6

Inhibition en % de la réduction de Cu^{++} (0,2 µM) par la caséine en présence de la substance B et du versène.

Temps d'incubation	µM substance B / mg caséine				µM versène / mg caséine		
	1,4	0,715	0,285	0,14	0,119	0,285	0,143
	inhibition %					inhibition %	
3 heures	100	100	100	100	100	100	100
3 jours	100	100	100	100	100	100	100
6 jours	70	48	49	50	50	100	100
9 jours	45,5	33	33	35,5	31,2	100	100

La dissociation du complexe versène-Cu^{++} est vraisemblablement plus lente que celle du complexe aspergillomarasmine B-Cu^{++} en milieu acide.

Résumé.

Nous avons étudié l'influence de l'aspergillomarasmine B sur les deux phases de l'oxydation de l'acide ascorbique catalysée par le Cu^{++}.

1) Sur l'interaction entre l'acide ascorbique (AH_2) et le catalyseur:

$$AH_2 + Cu^{++} \rightleftharpoons [AH_2Cu^{++}] \longrightarrow AH^{\cdot} + Cu^{+}$$

2) et sur la réoxydation aérobie de Cu^{+} en Cu^{++}:

$$Cu^{+} + 1/2\ O_2 + H^{+} \longrightarrow Cu^{++} + 1/2\ H_2O$$

Les deux phases sont inhibées par la substance B.

L'inhibition croît avec l'augmentation du rapport substance B/Cu^{++} et diminue avec l'augmentation du rapport AH_2/substance B. La vitesse initiale de l'oxydation de l'acide ascorbique suit une cinétique pseudomonomoléculaire en l'absence aussi bien qu'en présence de l'aspergillomarasmine B. Cette dernière ralentit la vitesse de l'oxydation et l'inhibition peut être constatée au bout de 2 à 4 jours. On peut donc considérer l'aspergillomarasmine B comme un antioxydant vis-à-vis de l'acide ascorbique.

Nous avons présenté une étude de l'oxydation des fonctions thiol de la cystéine, de la caséine et de la sérumalbumine, et l'inhibition de cette oxydation par la substance B. Nous avons constaté une inhibition très forte en présence de la substance B au début de la réaction mais l'inhibition diminue au bout de quelques jours d'incubation à cause de la dissociation lente du complexe substance B-Cu^{++}. La vitesse de dissociation paraît être supérieure à celle du complexe EDTA-Cu^{++} étudié par comparaison.

Nous présentons et discutons une hypothèse concernant le mécanisme d'interaction dans le système métal complexant-substrat oxydable. Les données cinétiques expérimentales semblent confirmer notre hypothèse.

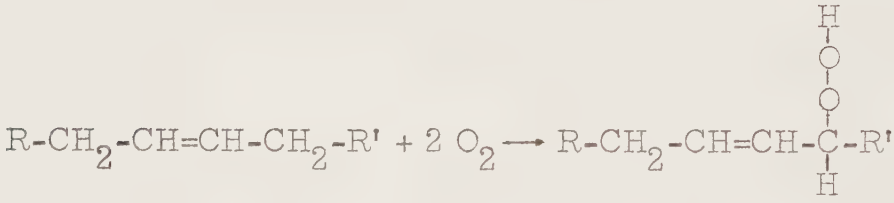
o o o

CHAPITRE XI

EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LA FORMATION DES PEROXYDES LIPIDIQUES DANS DES HOMOGENATS DE FOIE

Poursuivant nos études sur les activités biologiques de l'aspergillomarasmine B, nous avons chosi, comme système modèle, la formation des peroxydes lipidiques dans des homogénats hépatiques.

On sait que les acides gras polyéniques peuvent s'oxyder à l'air et en présence de certains catalyseurs pour donner des peroxydes lipidiques selon la formule générale :



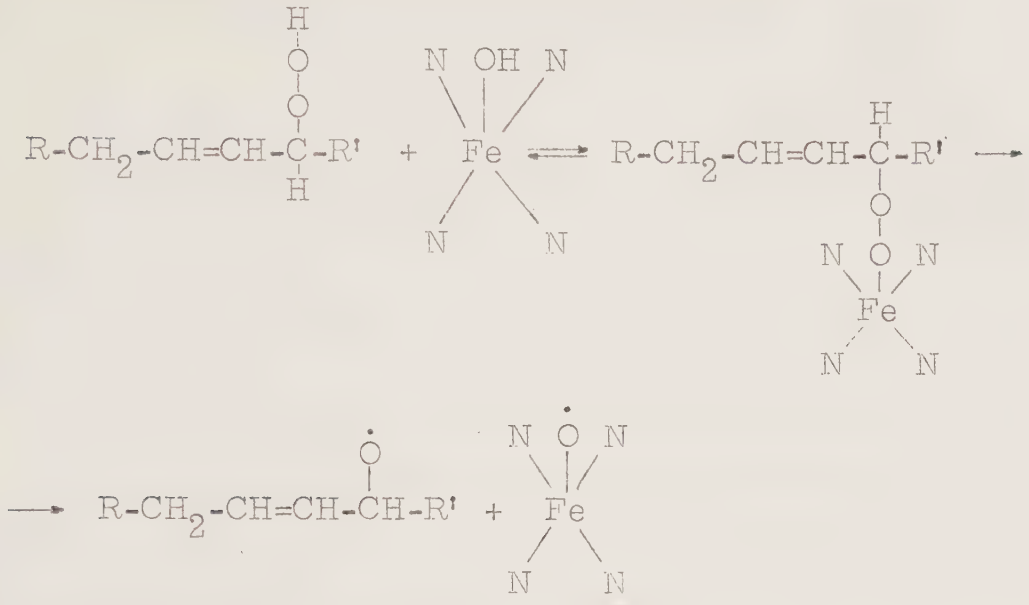
Cette oxydation est suivie le plus souvent de la rupture de la chaîne grasse.

L'oxydation non enzymatique des lipides insaturés de différents tissus a fait l'objet de nombreux travaux (67, 68, 69).

L'effet catalytique de l'acide ascorbique sur la formation des peroxydes lipidiques a été observé par Deutsch et al. en 1941 (67), puis par Elliot et Libet en 1944 (68). Tappel a étudié le mécanisme de cette réaction en présence d'hémoglobine et de cytochromes (70, 71).

Ses résultats indiquent que l'action catalytique de l'hématine s'exerce par la formation d'un composé lipide-peroxyde-hématine. Ce complexe se décompose ensuite en radicaux libres,

qui entretiennent la chaîne des réactions d'oxydation.



La réactivité de ces radicaux intermédiaires libres peut expliquer la fragmentation des acides gras et la destruction simultanée du catalyseur. Des ions ou d'autres composés liés au fer de l'hématine peuvent modifier considérablement l'action catalytique de cette dernière.

Par exemple, le cyanure inhibe l'action catalytique de l'hémoglobine en formant un hémichrome très stable avec le fer de l'hématine, et le peroxyde lipidique ne peut pas remplacer l'ion cyanure de ce complexe. Au contraire, les ions ammonium forment des hémichromes faibles avec le fer du noyau héminique, ils sont facilement remplacés par les peroxydes et augmentent l'activité catalytique de l'hématine.

D'autre part des substances azotées comme l'histidine, le tryptophane, des colorants, comme le bleu de méthylène et la thionine, ne forment pas d'hémichromes stables et leur activité inhibitrice est due aux effets stériques. Ce sont des molécules relativement grandes et, en s'attachant au fer du noyau héminique,

elles peuvent empêcher la formation du complexe hématine-peroxyde (72).

Ottolenghi a fait récemment une étude détaillée de la formation des peroxydes lipidiques dans des homogénat hépatiques et dans des suspensions de mitochondries (73, 74, 75). Il a montré qu'après addition d'acide ascorbique à ces milieux, les peroxydes se forment rapidement et l'acide ascorbique s'oxyde (co-oxydation).

L'action de l'acide ascorbique est potentialisée par des traces de fer (Fe^{++}). Le complexon (EDTA) en faible quantité (1 µM/1 µM d'acide ascorbique) inhibe la formation des peroxydes. En irradiant l'homogénat ou la suspension des mitochondries par les rayons U.V., Ottolenghi note également la formation rapide de peroxydes. Là encore, l'EDTA inhibe la réaction. Vu l'analogie entre la structure de l'aspergillomarasmine B et du complexon III, nous avons comparé l'action inhibitrice de ces deux composés.

Matériel et méthodes.

Pour nos expériences nous avons adopté le protocole d'Ottolenghi (75). Après lavage, le foie de cobaye a été broyé suivant les conditions décrites par les auteurs et les expériences effectuées sur des prélèvements de 8 ml de ce broyat. On a ajouté 7 ml d'une solution isotonique de chlorure de potassium à pH 7 pour les essais d'irradiation et 0,5 ml d'acide ascorbique 0,01 M (5 µM) pour les expériences d'oxydation ascorbique. Pour les expériences d'inhibition, on ajoute aux homogénats des concentrations différentes de la solution de l'aspergillomarasmine B ou l'EDTA, en amenant toujours le volume à 15 ml avec une solution de chlorure de potassium isotonique.

L'irradiation se fait avec une lampe à U.V. H.P.W. 125 w à une distance de 12-15 cm. La boîte de Petri est entourée de glace tet repose sur une couche de glace afin d'empêcher une trop grande élévation de température pendant l'irradiation (T = 25°C ± 2°). On veille à ce que la glace soit remplacée au fur et à mesure qu'elle fond.

Pour les expériences d'oxydation par l'acide ascorbique, les boîtes de Petri sont placées dans l'étuve à 37°C.

Nous avons déterminé la formation des peroxydes par la méthode à l'acide thiobarbiturique (76). Dans les deux cas, après irradiation aux rayons U.V. et incubation avec l'acide ascorbique, on effectue des prélèvements de 2 ml à 0, 20, 40 et 60 minutes à l'aide d'une pipette de précision. On mélange le prélèvement dans un tube à centrifuger avec 1 ml d'acide trichloracétique à 35% pour précipiter les protéines. Quand la série de prélèvements est terminée, on ajoute 2 ml d'acide thiobarbiturique en solution aqueuse à 0,75%. On met les tubes 15 minutes dans un bain-marie bouillant; on les refroidit ensuite et on rétablit le volume initial avec de l'eau bidistillée. On ajoute 2 ml d'acide trichloracétique à 70%. On laisse les tubes reposer pendant 20 minutes pour que la coloration devienne plus intense, puis on centrifuge 15 minutes à 5000 tours/minute. On effectue ensuite sur le surnageant une lecture au spectrophotomètre à 535 mμ. Comme témoin on utilise le même mélange avec 2 ml d'une solution de chlorure de potassium isotonique à pH 7, à la place de l'homogénat.

Cette méthode de l'acide thiobarbiturique a été employée par Kohn et Liversedge en 1944 (77). Ils ont remarqué une forte coloration des tissus incubés en milieu aérobie sous l'effet de cet

acide. La spécificité de cette méthode est discutée en détail par Landucci (78). L'acide 2thiobarbiturique, selon certains auteurs, agit sur les aldéhydes (79) et sur les sucres traités par l'acide chlorhydrique dilué (80). Ces colorations cependant, sont différentes de celles obtenues avec le même réactif après l'oxydation des acides gras. Les sucres donnent une coloration jaune dont le maximum d'absorption est à 450 mμ, tandis que les produits d'oxydation des acides gras donnent une coloration rose-orangée dont le maximum d'absorption est à 535 mμ.

La présence d'aldéhydes dans les produits d'auto-oxydation des acides gras a été remarquée par Gunstone (81) et Lundberg (82). Ce dernier, en étudiant le mécanisme d'oxydation du linoléate de méthyle, a pu mettre en évidence la formation des peroxydes et des cétones diéniques.

Il faut admettre avec ces auteurs que la coloration avec le maximum d'absorption à 535 mμ peut être observée avec l'ensemble des produits d'oxydation des acides gras.

Pour contrôler une altération éventuelle dans la structure de l'aspergillomarasmine B dans les conditions des expériences, nous avons effectué des chromatographies sur papier. Nous avons utilisé le papier Whatman n°1. Le solvant de développement était le mélange phénol-eau (8:2). La chromatographie a été effectuée par la méthode ascendante, la durée de migration étant de 16 heures. Les prélèvements (10 μl) ont été effectués après incubation de l'aspergillomarasmine B pendant 20, 40 et 60 minutes avec 5 μM d'acide ascorbique à 37°C pour les expériences d'oxydation ascorbique et, pour les expériences d'irradiation, les prélèvements ont été effectués après 5, 10, 30 et 60 minutes.

Résultats.

1. Oxydation par l'acide ascorbique.

La figure 23 montre l'étude de la formation des peroxydes, mesurée en fonction de l'absorption du pigment thiobarbiturique à 535 mμ. La formation des peroxydes est une fonction linéaire du temps. 1 μM d'aspergillomarasmine B inhibe à 68% environ et 1 μM d'EDTA donne la même inhibition. Dans les mêmes conditions, avec 0,1 μM de substance B, l'inhibition était de 29,4% après 30 minutes d'incubation, et avec 0,1 μM d'EDTA, 20 %.

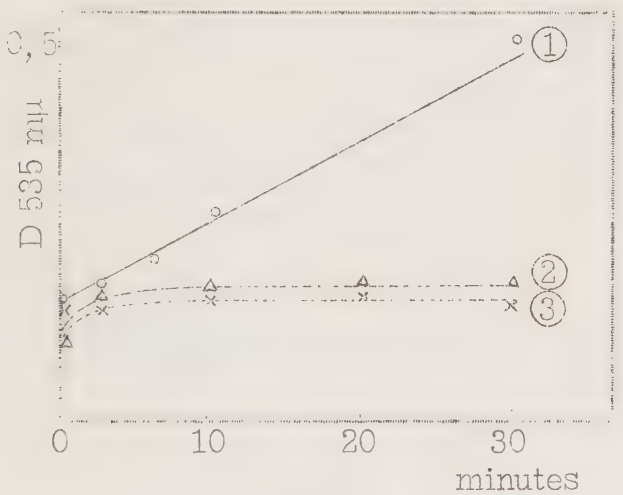


FIGURE 23

Inhibition de la formation des peroxydes lipidiques par l'EDTA et par l'aspergillomarasmine B, après incubation des homogénats de foie avec 5 μM d'acide ascorbique à 37°C.

Abscisses : temps d'incubation.
Ordonnées : densité optique à 535 μM.

Courbe 1 : Homogénat avec acide ascorbique sans inhibiteur.
Courbe 2 : id. avec 1 μM d'EDTA.
Courbe 3 : id. avec 1 μM d'aspergillomarasmine B.

Par contre, des quantités beaucoup plus fortes d'aspergillomarasmine B ou d'EDTA (100 µM) ne donnent pas d'inhibition plus importante que 1 µM. L'addition des ions Fe^{++} (0,1 µM) n'a pas augmenté la formation des peroxydes dans les homogénats, le système étant probablement saturé par des métaux provenant du tissu étudié. Pourtant, l'homogénat dialysé s'oxyde à peu de chose près à la même vitesse que l'homogénat total (fig. 24). Selon la chromatographie représentée dans la figure 25 (ci-contre), l'aspergillomarasmine B a le même aspect avant et après avoir été incubé avec 5 µM d'acide ascorbique.

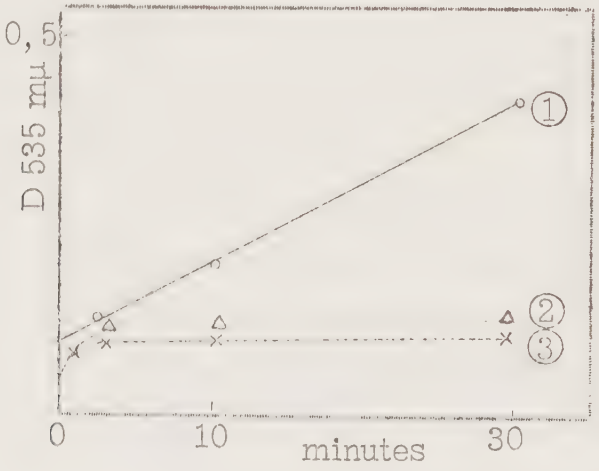


FIGURE 24

Inhibition de la formation des peroxydes lipidiques par l'EDTA et par l'aspergillomarasmine B après incubation des homogénats de foie dialysé avec 5 µM d'acide ascorbique à 37°C.

Abscisses : temps d'incubation.
Ordonnées : densité optique à 535 mµ.

Courbe 1 : Homogénat de foie dialysé, incubé avec 5 µM d'acide ascorbique.
Courbe 2 : id. avec 1 µM d'EDTA.
Courbe 3 : id. avec 1 µM d'aspergillomarasmine B.

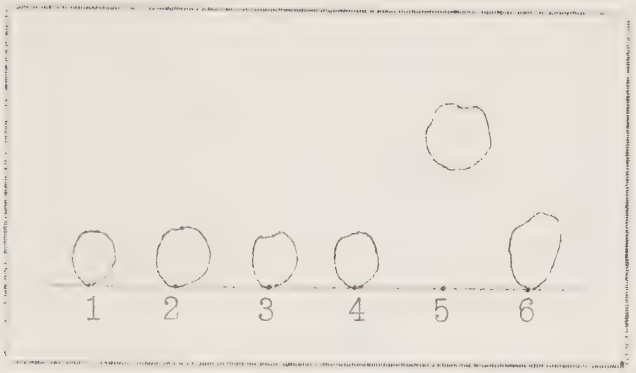


FIGURE 25

Chromatographie ascendante sur papier Whatman n°1, de l'aspergillomarasmine B incubée avec 5 µM d'acide ascorbique. Solvant de développement : phénol-eau (8:2); durée de migration: 16 heures. Révélation par la ninhydrine.

1. Substance B non incubée;
2. après incubation de 20 minutes;
3. après incubation de 40 minutes;
4. après incubation d'une heure;
5. glycine 0,02 mg;
6. acide aspartique 0,02 mg.

2. Oxydation par les rayons U.V.

La figure 26 (p. 96) représente la formation des peroxydes dans les homogénats par l'absorption du pigment thiobarbiturique à 535 mµ sous l'influence des rayons U.V. 1 µM d'aspergillomarasmine B inhibe la formation des peroxydes à 73% après une heure d'irradiation. Dans les mêmes conditions, la même concentration d'EDTA inhibe à 46% environ. En abaissant la concentration de la substance B et de l'EDTA à 0,1 µM ou à 0,01 µM, on obtient encore une faible inhibition (tableau 7, p. 97). Selon la

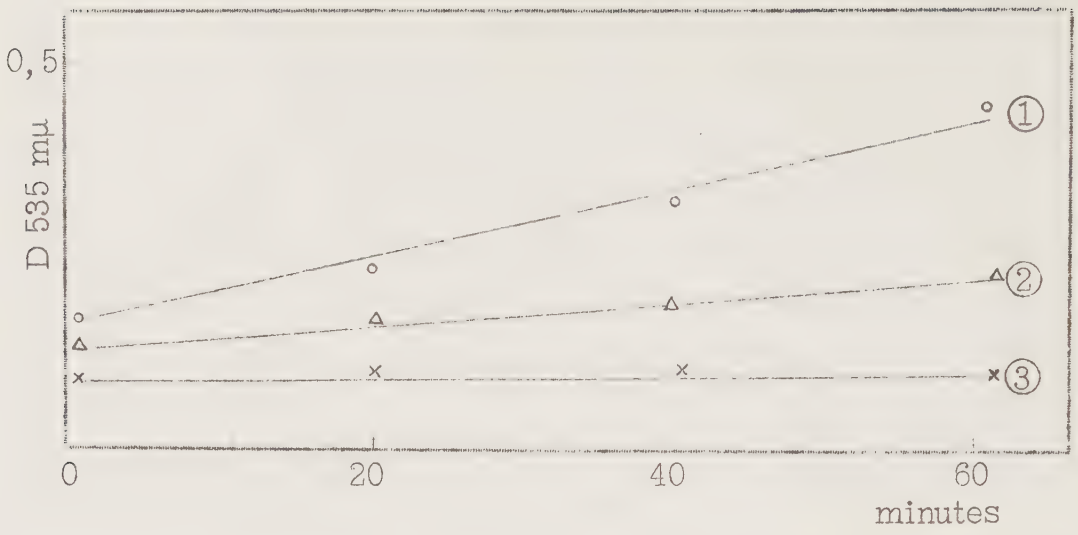


FIGURE 26

Inhibition de la formation des peroxydes lipidiques par l'EDTA et par l'aspergillomarasmine B dans des homogénats de foie après irradiation aux rayons U.V.

Abscisses : temps d'irradiation.
Ordonnées : densité optique à 535 mμ.

Courbe 1 : homogénat irradié, sans inhibiteur.
Courbe 2 : homogénat irradié en présence de 1 μM d'EDTA.
Courbe 3 : homogénat irradié en présence de 1 μM d'aspergillomarasmine B.

chromatographie représentée dans la figure 27 (p. 98), l'aspergillomarasmine B ne change pas au cours de ces expériences.

Discussion.

Nos résultats sont en accord avec les données de la littéraure. Sous l'influence des rayons U.V. ou sous l'effet d'incubation des homogénats hépatiques avec acide ascorbique, des peroxydes se forment.

Le mécanisme de ces réactions n'est pas encore complè-

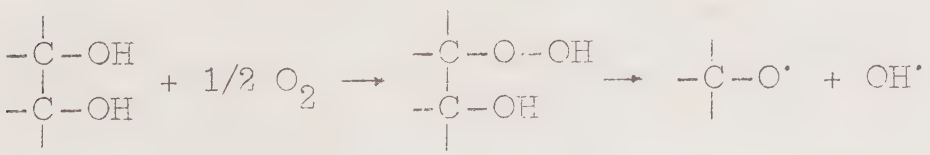
TABLEAU 7

Inhibition de la formation des peroxydes lipidiques par l'aspergillomarasmine B et par l'EDTA en fonction de temps d'irradiation aux rayons U.V.

µM d'inhibiteur	temps d'irradiation en minutes	pourcentage d'inhibition par l'EDTA	pourcentage d'inhibition par la substance B
1	20	32	61,2
1	40	41,2	69,7
1	60	46,5	73,2
0,1	20	24	45,7
0,1	40	26,5	49,2
0,1	60	46,5	49,0
0,01	20	8	12,2
0,01	40	11	13
0,01	60	17	16,5

tement élucidé, mais on peut admettre néanmoins que dans les deux cas les radicaux libres produits pendant l'oxydation jouent un rôle important dans la formation des peroxydes.

En présence de l'acide ascorbique il y a probablement formation d'un composé peroxydique instable qui donne ensuite des radicaux libres :



L'on sait que les ions Fe^{++} en présence d'eau oxygénée

FIGURE 27

Chromatographie ascendante sur papier Whatman n°1, de l'aspergillomarasmine B irradié par des rayons U.V.
Solvant de développement: phénol-eau (8:2); révélation par la ninhydrine.

1. substance B non irradiée;
2. après irradiation de 15 minutes;
3. après irradiation de 10 minutes;
4. après irradiation de 30 minutes;
5. après irradiation de 60 minutes;
6. 0,02 mg de glycine;
7. 0,02 mg d'acide aspartique.

produisent des radicaux libres $H^{\cdot}$ et $OH^{\cdot}$.

Selon Stein (83), les rayons U.V. agissent par le même mécanisme en produisant des radicaux libres qui sont des agents réducteurs.

L'inhibition par l'aspergillomarasmine B et par l'EDTA peut être expliquée soit par chélation : ils privent le milieu des métaux dont l'action catalytique serait indispensable à la formation des peroxydes, soit par un autre mécanisme inconnu, tel par exemple qu'il réagit directement avec les radicaux libres.

Ottolenghi a montré que ces réactions d'oxydation par des rayons U.V. ou incubation avec de l'acide ascorbique,

inactivent plusieurs systèmes enzymatiques des mitochondries (succinoxidase, cholineoxidase, etc.). On peut donc prévoir une action protectrice de l'aspergillomarasmine B sur ces systèmes enzymatiques, étant donné son fort pouvoir chélateur.

Résumé.

Nous avons étudié l'action de l'aspergillomarasmine B sur la formation des peroxydes lipidiques dans des homogénats hépatiques sous l'influence des rayons U.V. d'une part, et l'oxydation par incubation avec de l'acide ascorbique d'autre part.

1 µM d'aspergillomarasmine B inhibe la formation des peroxydes à 68% quand on incube des homogénats hépatiques avec 5 µM d'acide ascorbique à 37°C pendant une heure, et à 73% quand on provoque la formation des peroxydes lipidiques par des rayons U.V.

L'EDTA, étudié par comparaison, se comporte à peu de chose près de la même manière.

° ° °

CHAPITRE XII

ACTION ANTI-PEROXYDASIQUE DE L'ASPERGILLOMARASMINE B DANS LES REACTIONS CATALYSEES PAR L'HEMOGLOBINE ET PAR LE COMPLEXE HEMOGLOBINE-HAPTOGLOBINE

Nous avons montré précédemment que l'aspergillomarasmine B inhibe la formation des peroxydes lipidiques dans les homogénats hépatiques, ceci sous l'influence catalytique des rayons U.V., ou par incubation en présence d'acide ascorbique, à 37°C.

Dans ce chapitre nous présentons une étude concernant les activités anti-peroxydasiques de l'aspergillomarasmine B, dans les réactions catalysées par l'hémoglobine d'une part, et par le complexe hémoglobine-haptoglobine d'autre part.

L'hémoglobine, dont l'action catalytique a fait l'objet de nombreux travaux, fut la première peroxydase découverte (84). Son activité peroxydasique a conduit à des résultats souvent contradictoires. En la comparant aux peroxydases végétales, Willstätter (85) a trouvé que l'activité peroxydasique de l'hémoglobine était 10 000 à 30 000 fois inférieure à celles des peroxydases végétales. Entre pH 5 et 5,6, l'hémoglobine catalyse faiblement l'oxydation de l'iodure de potassium par une peroxydase organique.

Jayle et Polonovski (86, 87, 88) ont étudié l'activité peroxydasique de l'hémoglobine. Selon eux, l'hémoglobine doit être considérée comme une peroxydase d'activité moyenne, ayant un comportement différent de celui des peroxydases végétales, puisqu'elle oxyde directement l'acide ascorbique, la cystéine et

le glutathion, et qu'elle augmente d'environ 20 fois plus que l'eau oxygénée, l'activité des peroxydes d'alcoyle.

L'hémoglobine forme avec l'haptoglobine (protéine sérique) un complexe très stable. Ce complexe a une activité peroxydasique beaucoup plus élevée que l'hémoglobine seule (89, 90).

Bien qu'on ne connaisse pas encore exactement la nature de la liaison hémoglobine-haptoglobine, il semble que les forces électrostatiques jouent un rôle important dans la cohésion des deux molécules; toutefois, les forces de Van der Waales contribuent aussi à la liaison (91). Un certain nombre de polyélectrolytes, comme la protamine, l'héparine, l'alginate de glycol (acide polymannuronique), peuvent inhiber la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine (92). Parmi les substances étudiées, l'acide ribonucléique provenant de la levure ou du thymus semble être le plus inhibiteur (91) en ce qui concerne la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine.

En ce qui concerne le mécanisme de l'activation du pouvoir peroxydasique de l'hémoglobine par l'haptoglobine, il existe plusieurs théories (93). Selon l'une d'elles, l'haptoglobine protègerait l'hémoglobine contre les dénaturations et contre la destruction du noyau héminique pendant les réactions peroxydasiques (91).

Nous avons donc étudié l'effet de l'aspergillomarasmine B, d'une part sur la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine, d'autre part sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, soit seule, soit sous forme de complexe hémoglobine-haptoglobine.

Matériel et méthodes.

L'hémoglobine : C'est une hémoglobine de cheval, préparée selon la méthode de Jayle (94). Pour nos expériences, nous avons utilisé une solution M/20 000 en fer héminique, obtenue extemporanément par dilution d'une solution initiale M/2 000.

L'iodure de potassium est en solution M/10.

Le tampon acétate est à pH 4,4 (685 ml d'acide acétique N/10 et 315 ml d'acétate N/10).

L'hydroperoxyde d'éthyle se trouve en solution N/10.

La solution d'hyposulfite N/100 est préparée chaque jour par dilution d'une solution N/10.

L'acide ascorbique (Rhône-Poulenc) est employé en solution M/100, préparée au moment de l'expérience à partir d'une solution M/100.

Le chlorhydrate de cystéine (Rhône Poulenc) est utilisé de la même manière que l'acide ascorbique.

L'aspergillomarasmine B : Concentrations diverses obtenues à partir d'une solution sodique M/10 à pH 7.

Nous nous sommes servis de divers sérums humains pathologiques.

L'appareil que nous avons utilisé est "l'haptoglobinomètre" de Jayle (102). Le principe de dosage de l'haptoglobine sérique par activitation peroxydasique de l'hémoglobine est le suivant et correspond à l'équation :

$$C_2H_5OOH + 2\,IH \xrightarrow{\text{hémoglobine-haptoglobine}} C_2H_5OH + I_2 + H_2O$$

Le peroxyde libère l'iode par oxydation. Cet iode est titré par la solution d'hyposulfite. L'hémoglobine, dans les conditions du dosage, a une faible activité qui augmente sensiblement en présence d'haptoglobine. L'oxydation est proportionnelle à la quantité du complexe formé et la réaction hémoglobine-haptoglobine est stoechiométrique.

Etude de la méthode d'activation.

Dans les 5 creusets de la série postérieure de l'haptoglobinomètre, on introduit 0,1 ml d'hémoglobine M/20 000 (en fer hématique); dans 4 de ces creusets, 0,02 ml de sérum. La cinquième capsule sert de témoin. On mélange en agitant l'hémoglobine et l'haptoglobine. Dans les creusets de la rangée antérieure on met 1 ml de peroxyde d'éthyle N/10 et 10 ml de la solution de tampon. Ensuite l'on ajoute dans les capsules de la série postérieure, 3 ml de la solution d'iodure de potassium. Avant de mettre en route la première réaction, on introduit dans le premier creuset antérieur 0,5 ml d'iode N/100 (afin d'inactiver l'excès de l'hémoglobine). On appuie sur le chronomètre et, en même temps, on déverse le contenu de ce creuset dans celui de la rangée postérieure correspondante. Ensuite on verse 0,5 ml d'iode dans le 2-ème creuset de la rangée antérieure et au temps "une minute" on met en route la deuxième réaction. On procède de même au bout de 2, 3 et 4 minutes pour les creusets 2, 3 et 4. A 4' 25" du début de l'expérience, on ajoute l'indicateur dans le premier récipient et l'on titre l'iode libéré avec de l'hyposulfite jusqu'à décoloration. Celle-ci doit être complète au temps 5 minutes pour le premier dosage, au temps 6 minutes pour le deuxième, etc.

Calcul des indices. Nous avons exprimé nos résultats en "indice d'haptoglobine". C'est le pourcentage d'haptoglobine présent dans un sérum qui est capable de saturer volume à volume une solution d'hémoglobine équine M/20 000 en fer hématique : (quand chaque molécule d'hémoglobine est complexée par une molécule haptoglobinique, l'addition d'un excès de sérum est sans influence sur l'activité peroxydasique du complexe) 1 unité représente environ 105,4 mg d'haptoglobine pour 100 ml de sérum.

On soustrait le témoin hémoglobinique de chacun des résultats obtenus après le dosage et le chiffre est rapporté à 0,05 ml de sérum, pour être traduit ensuite en indice d'haptoglobine.

Nous avons essayé, en dehors de l'iodure de potassium, d'autres substrats oxydables comme l'acide ascorbique, la cystéine, le rimifon, le calciférol, la tricléine et la thiamine. En travaillant avec ces accepteurs, nous avons utilisé la méthode "chronométrique" (86). On mesure le temps d'oxydation d'une quantité déterminée d'une substance oxydable par le complexe hémoglobine-haptoglobine et l'hydroperoxyde d'éthyle de la façon suivante :

Dans une cuve de la rangée postérieure de l'haptoglobinomètre, on introduit 0,1 ml d'hémoglobine M/20 000 en fer hématique, 3 ml d'iodure de potassium N/10 et quelques grains de l'indicateur "thiodène"(Prolabo). Dans une cuve de la rangée antérieure, on met 10 ml de tampon acétate à pH 4,4 , 1 ml de peroxyde d'éthyle N/10 et la substance oxydable x ml. On déverse le contenu de la cuve antérieure dans la cuve postérieure et en même temps on déclenche le chronomètre. Si les substances étudiées sont préférentiellement oxydées, l'iode ne commence à être libéré qu'après l'oxydation complète de ces substrats. On mesure le

temps d'apparition de la coloration violette (iode + thiodène) qui indique l'oxydation totale de l'accepteur.

Résultats obtenus.

Nous avons étudié l'action de l'aspergillomarasmine B dans quatre cas différents :

1) Inhibition de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine.

2) Inhibition de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine.

(Déterminées par la méthode d'activation, avec l'iodure de potassium comme substrat oxydable.)

3) Inhibition de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, mesurée directement par l'oxydation des différents substrats.

4) Inhibition de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine, mesurée indirectement par l'oxydation des différents substrats.

(Déterminées par la méthode chronométrique.)

1 et 3. Inhibition de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine seule.

Comme le montre le tableau 8 (p. 106), nos résultats ont varié avec les substrats oxydables utilisés; 10 µM de substance B inhibent 17% de l'activité lorsque l'accepteur est l'iodure de potassium, tandis que 0,1 µM de cette même substance B inhibe l'activité peroxydasique de l'hémoglobine à 79% quand l'accepteur est l'acide ascorbique, et à 65% lorsqu'on emploie la cystéine. Si nous employons d'autres substrats oxydables, comme le

TABLEAU 8

Inhibition de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine seule, par l'aspergillomarasmine B avec trois accepteurs différents.

µM accepteur	Quantité de substance B donnant 50% d'inhibition en µM	Inhibition max. %	Quantité de substance B donnant max. d'inhib. en µM	µM accepteur / µM substance B pour inhib. 50 %	µM accepteur / µM substance B pour inhib. max.%
Iodure de potassium + 300	-	17	10	-	30
ac. ascorbique 5 ++	0,034	79	0,1	128	50
cystéine ++ 10	0,04	65	0,1	250	100

\+ effectué par la méthode d'activation.
++ effectué par la méthode chronométrique.

rimifon, le calciférol, la trioléine et la thiamine, nous constatons que l'hémoglobine oxyde l'iodure de potassium de préférence, donc on ne peut se servir de la méthode chronométrique dans ce cas.

2 et 4. Inhibition de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine.

Ces expériences ont été effectuées selon deux protocoles différents; dans le premier cas on mélange l'hémoglobine avec

l'haptoglobine (sérum) et on y ajoute en dernier lieu la substance B. Selon le deuxième procédé, on mélange l'hémoglobine et la substance B et on y adjoint, en dernier, l'haptoglobine. Si l'inhibition a la même valeur avec ces deux systèmes, c'est que l'inhibiteur n'interfère pas avec la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine. Une inhibition plus forte dans le deuxième cas peut signifier soit une inhibition de la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine, soit l'inhibition de l'activité peroxydasique de ce complexe, soit les deux mécanismes simultanément.

La figure 28 représente l'action de la substance B sur la

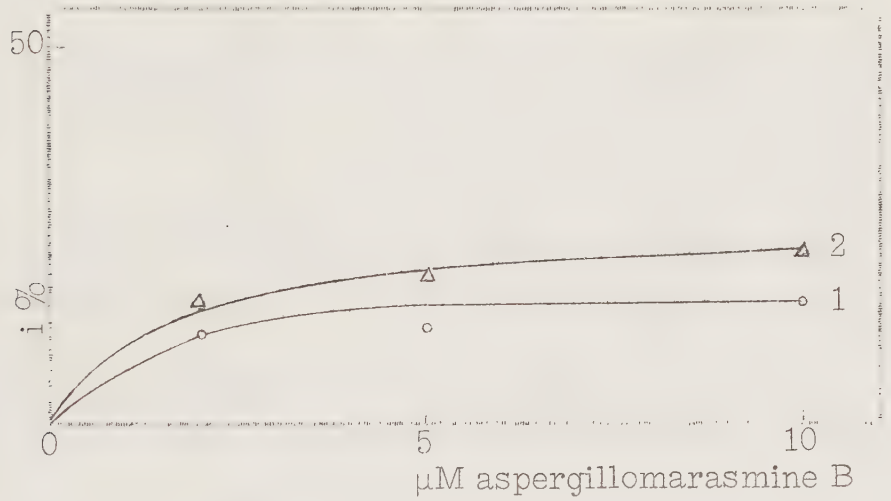


FIGURE 28

Influence de l'aspergillomarasmine B sur la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine et sur son activité peroxydasique.

Selon deux protocoles :

1) Ordre de mélange : hémoglobine, haptoglobine, substance B.
2) Ordre de mélange : hémoglobine, substance B, haptoglobine.

Mesures faites par la méthode d'activation, en présence d'iodure de potassium comme accepteur.

Abscisses : µM aspergillomarasmine B.
Ordonnées : Inhibition %.

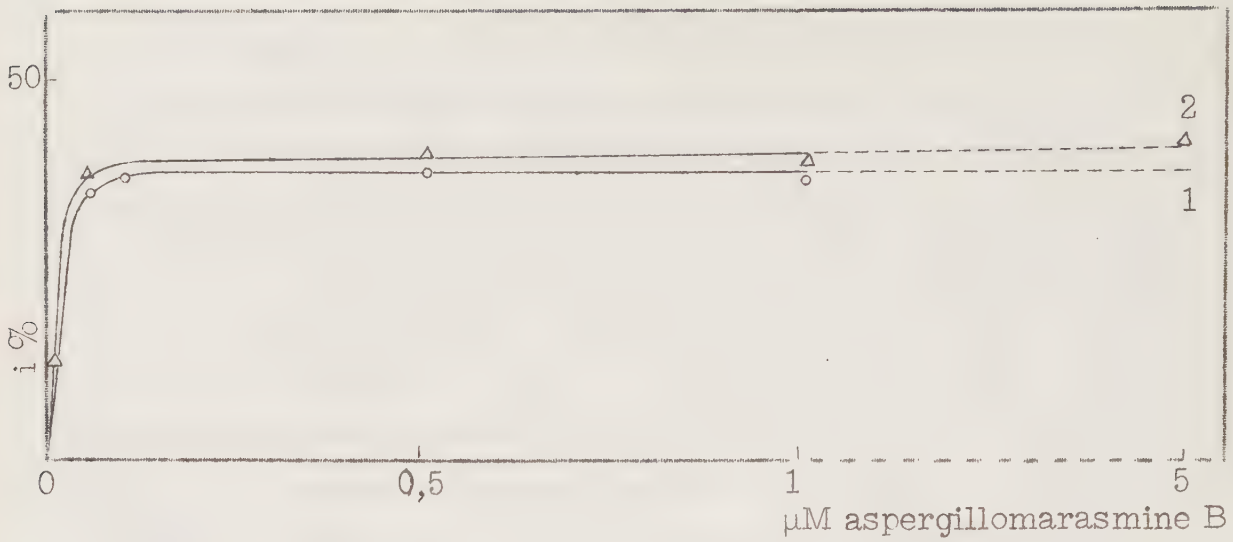


FIGURE 29

Influence de l'aspergillomarasmine B sur la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine et sur son activité peroxydasique.

Selon deux protocoles :

1) Ordre de mélange : hémoglobine, haptoglobine, substance B.
2) Ordre de mélange : hémoglobine, substance B, haptoglobine.

Mesuré par la méthode "chronométrique", en présence de cystéine comme accepteur.

Abscisses : µM aspergillomarasmine B.
Ordonnées : Inhibition %.

formation du complexe hémoglobine-haptoglobine et sur son activité peroxydasique en présence d'iodure de potassium comme accepteur. Dans les deux cas l'inhibition, bien que faible, est semblable.

Les figures 29 et 30 montrent les résultats d'expériences analogues effectuées en présence de cystéine et d'acide ascorbique comme accepteurs. L'inhibition par la substance B est importante, mais elle porte toujours sur l'activité peroxydasique du complexe

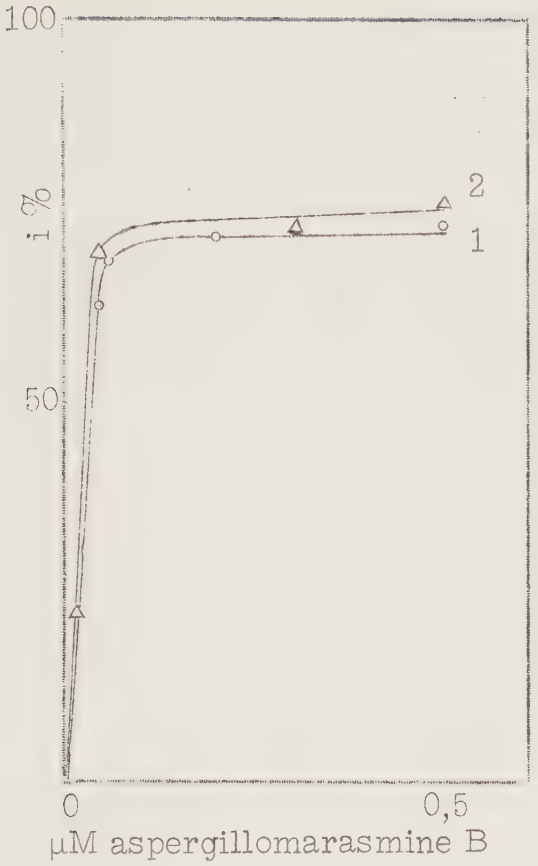


FIGURE 30

Influence de l'aspergillomarasmine B sur la formation du complexe hémoglobine-haptoglobine et sur son activité peroxydasique.

Selon deux protocoles :

1) Ordre de mélange : hémoglobine, haptoglobine, substance B.
2) Ordre de mélange : hémoglobine, substance B, haptoglobine.

Mesuré par la méthode "chronométrique" en présence de l'acide ascorbique comme accepteur.

Abscisses : µM aspergillomarasmine B.
Ordonnées : Inhibition %.

hémoglobine-haptoglobine et n'a aucun effet sur la formation de ce complexe.

Nous avons groupé les résultats de ces dosages dans le tableau 11 (p. 110).

TABLEAU 9

Inhibition de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine par l'aspergillomarasmine avec trois accepteurs différents.

µM accepteur	µM substance B donnant 50 % d'inhibition	Inhibition max. %	µM substance B donnant inhib. max.	µM accepteur / µM substance B pour i 50 %	µM accepteur / µM substance B pour i max %
Iodure de potassium +					
300	-	15	10	-	30
300	-	20	10	-	30
ac.ascorbique ++					
5	0,03	72	0,2	166	25
5	0,02	73	0,2	250	25
cystéine ++					
10	-	37	0,1	-	100
10	-	38	0,1	-	100

\+ effectué par la méthode d'activation;
++ effectué par la méthode chronométrique.

Abréviation utilisée : Hb.-Hp. = complexe hémoglobine-haptoglobine.

Ordre de mélange : Hb., sérum (Hp.), aspergillomarasmine B; chiffres non soulignés.

Ordre de mélange : Hb., aspergillomarasmine B, sérum (Hp.); chiffres soulignés.

L'inhibition produite par la substance B est très importante en présence d'acide ascorbique comme accepteur. Avec l'iodure de potassium, l'inhibition est semblable à celle obtenue avec, comme seul catalyseur, l'hémoglobine. L'activité inhibitrice de la substance B en présence de cystéine comme accepteur est très importante avec l'hémoglobine comme catalyseur, mais elle est beaucoup plus faible avec le système peroxydasique hémoglobine-haptoglobine.

Discussion.

Les travaux de Keilin et Mann (95), et ceux de Chance (96, 97), ont montré que le mécanisme de la réaction peroxydasique est le suivant :

$$\text{peroxydase} + \text{peroxyde} \longrightarrow [\text{peroxydase . peroxyde}]$$

Une molécule de peroxyde s'attache à un atome de Fe de la peroxydase, il y a formation d'un complexe qui réagit avec une substance oxydable par le complexe [peroxydase. peroxyde] :

$$\text{accepteur} + [\text{peroxydase. peroxyde}] \rightleftharpoons \text{accepteur oxydé} + \text{peroxydase} + H_2O$$

Dans notre cas on peut écrire la réaction de la façon suivante :

$$\text{Hb.} + C_2H_5OOH \rightleftharpoons \text{Hb.OOH} + \text{alcool}$$

$$\text{Hb.OOH} \left\{ \begin{array}{l} + \text{acide ascorbique} \\ + \text{ou cystéine} \\ + \text{ou iodure} \end{array} \right. \rightleftharpoons \text{Hb.} \left\{ \begin{array}{l} + \text{ac. déhydro ascorb.} \\ + \text{cystine} \\ + \text{iode} \end{array} \right. + H_2O$$

Le fer de l'hémoglobine a 6 valences de coordination; 4 sont occupées par les 4 atomes d'azote des noyaux pyrroliques, le cinquième

est lié à l'imidazole de la globine et par le sixième il peut fixer de l'oxygène, de l'oxyde de carbone ou d'autres fonctions.

L'aspergillomarasmine B ayant un pouvoir chélateur élevé, entre en compétition avec les divers accepteurs et forme un complexe avec le fer héminique, inhibant ainsi l'activité peroxydasique de l'hémoglobine.

Nous pouvons constater d'après les expériences décrites, que l'activité inhibitrice de la substance B dépend de la nature de l'accepteur. Avec l'iodure de potassium, l'inhibition est très faible et il n'y a aucune différence entre l'inhibition de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine seule et celle du complexe hémoglobine-haptoglobine.

Par contre, en utilisant l'acide ascorbique comme accepteur, nous avons constaté une très grande différence : le rapport µM accepteur/µM substance B est de 50, pour le maximum d'inhibition avec l'hémoglobine seule comme accepteur, et de 25 quand le catalyseur est le complexe hémoglobine-haptoglobine. Ces différences augmentent encore si l'accepteur est la cystéine. Il faut un rapport µM accepteur/µM substance B = 100 pour inhiber à 65-68% l'activité peroxydasique de l'hémoglobine seule, tandis que le maximum d'inhibition en présence de l'haptoglobine est seulement de 37-38%, pour le même rapport accepteur/substance B.

L'inhibition par l'aspergillomarasmine B dépend donc de la nature de l'accepteur et ceci peut avoir une grande importance. On serait en droit d'espérer une action sélective de la substance B sur certains systèmes enzymatiques, action qui pourrait être supprimée grâce à des substrats ayant plus d'affinité pour le système inhibé que l'aspergillomarasmine B.

La substance B n'inhibe pas la formation du complexe

hémoglobine-haptoglobine. D'autre part ces résultats concordent difficilement avec la théorie courante concernant le mécanisme de la réaction peroxydasique de l'hémoglobine. On admet que le complexe hémoglobine-peroxyde réagit dans une réaction bimoléculaire avec l'accepteur selon le schéma suivant :

$$Hb - OOR + AH_2 \longrightarrow Hb + H_2O + A + OR^{\cdot}$$

Ce schéma n'admet pas la formation d'un complexe hémoglobine-peroxyde-accepteur, se décomposant ensuite en Hb, H_2O, alcool et accepteur oxydé. Or il est difficile d'imaginer une inhibition très forte de l'oxydation de certains accepteurs et une inhibition faible ou nulle pour d'autres sans admettre la formation d'un tel complexe. Par contre, si l'accepteur devait se lier d'une façon transitoire au complexe Hb-OOR, on peut imaginer qu'il pourrait être déplacé par compétition en présence de la substance B. L'inhibition dépendra alors des affinités relatives de la substance B et de l'accepteur, pour la position spécifique sur le complexe Hb-OOR. On peut exclure, ou du moins rendre très improbable, l'action de la substance B sur la première phase de la réaction, c'est-à-dire la formation du complexe Hb-OOR à partir de hémoglobine et de peroxyde.

L'inhibition très forte obtenue en présence d'acide ascorbique comme accepteur peut avoir un autre mécanisme aussi : si le radical libre $AH^{\cdot}$ est un meilleur aceepteur que l'AH_2, la vitesse de l'oxydation de l'acide ascorbique dependra aussi de la vitesse de formation de radical libre $AH^{\cdot}$. La réaction $AH_2 \longrightarrow AH^{\cdot} + H$ est catalysée par des métaux. Le mélange réactionnel contient de la porphyrine et du fer libre (91), tous deux pouvant oxyder l'acide ascorbique en $AH^{\cdot}$. Cette réaction $AH_2 \longrightarrow AH^{\cdot} + H$ peut être inhibée par la substance B d'une façon

très efficace. Ce mécanisme peut expliquer l'inhibition plus forte obtenue avec l'acide ascorbique comme accepteur.

Résumé.

Nous avons étudié l'action de l'aspergillomarasmine B sur la formation du couple hémoglobine-haptoglobine, sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, ainsi que sur l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine.

L'importance de l'inhibition dépend de la nature de l'accepteur utilisé. Nous avons constaté une inhibition très forte avec l'hémoglobine seule, en présence d'acide ascorbique ou de cystéine comme accepteurs.

L'activité anti-peroxydasique de la substance B est moins forte quand l'hémoglobine est complexée par l'haptoglobine, surtout si l'on emploie de l'iodure de potassium et de la cystéine comme accepteurs.

En présence d'acide ascorbique la substance B inhibe fortement l'activité peroxydasique du complexe aussi bien que celle de l'hémoglobine libre.

La formation du complexe hémoglobine-haptoglobine ne semble pas être influencée par l'aspergillomarasmine B.

Le mécanisme de l'inhibition est discuté à la lumière des données accumulées sur le mécanisme de la réaction peroxydasique des hémoprotéines. Nos résultats suggèrent la formation d'un complexe hémoglobine-OOR-accepteur. La plus forte inhibition, obtenue avec l'acide ascorbique comme accepteur, peut être expliquée par l'inhibition de la formation du radical AH· qui serait l'accepteur véritable.

o o o

CHAPITRE XIII

INFLUENCE DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LE METABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES CHEZ ESCHERICHIA COLI B.

De nombreux travaux ont été publiés concernant le rôle que les acides aminés et les peptides jouent dans le métabolisme cellulaire et dans la synthèse des protéines. Des recherches sur l'utilisation de certains acides aminés pour la biosynthèse des acides nucléiques ont montré, que les atomes d'azote 1, 3 et 9 de la molécule purique proviennent respectivement de l'acide aspartique, de la glutamine, de la glycine et de l'acide glutamique (98, 99, 100, 101).

D'autre part, Lochte, en étudiant l'effet de l'héparine et de l'EDTA sur la synthèse des ADN, a trouvé que le versène, pour une concentration de 0, 5 mg/ml, diminue la synthèse des acides désoxyribonucléiques dans la moelle (102).

L'effet de l'aspergillomarasmine B sur la synthèse des acides nucléiques paraissait donc intéressant car il renferme de l'acide aspartique et du glycocolle et, d'autre part, sa structure et ses activités biologiques rappellent celles du versène.

Matériel et méthodes.

La souche bactérienne utilisée était Escherichia coli B. (Institut Pasteur). La composition du milieu de culture est le suivant :

NH_4Cl	(Prolabo)	R.P.	0,1 %
KH_2PO_4	(Prolabo)	R.P.	0,3 %
Na_2HPO_4	(Prolabo)	R.P.	0,6 %
NaCl	(Prolabo)	R.P.	0,5 %
$MgSO_4$	(Prolabo)	R.P.	0,01 %
Eau distillée			900 ml

Les cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers de 500 ml. L'aspergillomarasmine B est dissous dans le milieu même à l'aide de soude N (100 mg de substance B dans 1 ml de soude N). On stérilise une solution de glucose à 4%, que l'on ajoute à ce milieu à raison de 100 ml de glucose pour 900 ml de culture.

Ensuite on prélève de chaque erlenmeyer 5 ml du milieu synthétique que l'on verse dans des tubes à essais, afin de préparer l'inoculum. Les milieux ont été ensemencés par des inoculi incubés durant 6 à 10 heures. Le temps d'incubation à 37°C pour ces milieux variait de 15 à 22 heures. Nous avons fait trois expériences avec des milieux de culture où l'on avait fait barboter de l'air et un essai sans barbotage. Suivant nos expériences, la quantité d'aspergillomarasmine B ajoutée aux milieux de culture variait de 100 γ - 300 γ/ml.

Après incubation, les milieux ont été centrifugés, lavés trois fois avec 50 ml d'eau physiologique et délipidés deux fois par 50 ml d'un mélange d'alcool-éther (3:1), ceci pour faciliter l'extraction des constituants acidosolubles (103).

Après délipidation, les culots bactériens ont été séchés dans un dessicateur sous vide et nous avons pesé les bactéries une fois séchées.

Extraction des constituants acidosolubles.

Deux extractions à froid durant, chacune, 20 minutes ont été faites sur les culots bactériens par une solution d'acide perchlorique à 1 %. Afin d'éviter l'hydrolyse des constituants instables, on ramène le pH à 7 par une solution de soude N. Nous avons ainsi éliminé les sucres, des phosphates, des nucléotides et phospholipides solubles dans le mélange alcool-éther ou dans l'acide. Ces substances pourraient interférer dans les dosages des acides nucléiques (104).

Dans ces fractions acidosolubles, nous avons dosé le phosphore par la méthode de Macheboeuf (105) et l'azote par la méthode dite micro Kjeldahl.

Extraction des acides ribonucléiques.

Pour pouvoir doser les acides nucléiques séparément, nous avons utilisé la méthode de séparation d'Ogur et Rosen (106). Le principe de ce dosage repose sur les différences de solubilité de l'ARN et de l'ADN. L'ARN est solubilisé après un traitement par l'acide perchlorique à 5% (on agite successivement durant 24 heures, puis durant 16 heures, en maintenant la température à 0°C). L'ADN, dans ces conditions, reste insoluble. Après centrifugation, le ribose a été dosé dans les surnageants selon la méthode de Ceriotti (107) et le phosphore selon la méthode de Macheboeuf.

Le dosage de l'acide ribonucléique selon Ceriotti est basé sur la conversion du ribose en furfural, lequel donne alors une réaction colorée avec l'orcinol en présence de Cl_2Cu comme catalyseur; ceci doit s'effectuer en milieu acide et à chaud. La colora-

ration obtenue est extraite par l'alcool isoamylique et, après centrifugation, on effectue des mesures au spectrophotomètre, à 675 mμ.

Cependant, selon cette méthode, seuls les nucléotides puriques sont hydrolysés totalement, tandis que les nucléotides pyrimidiques ne le sont que partiellement ou pas du tout (108). Le résultat de nos dosages nous a donc donné les quantités de ribose-furfural provenant des seuls nucléotides puriques; à partir de ces valeurs nous avons calculé la quantité théorique du ribose total. Nous avons utilisé comme témoin une solution de D(-)ribose Hoffmann La Roche.

Dans l'acide ribonucléique standard, utilisé par Ceriotti, 57,6% du ribose total était lié aux purines, tandis que selon Webb (109), les nucléotides puriques ne représenteraient que 50% de l'ensemble des nucléotides.

Pour calculer les résultats, il faut tenir compte également d'une interférence plus ou moins importante des acides désoxyribonucléiques. Les différents auteurs estiment que dans la coloration obtenue dans ces conditions, la part qui revient aux ADN peut varier de 0,85 à 12,5 %.

Si l'on veut calculer la quantité d'ARN à partir des dosages de phosphore, les difficultés sont presque aussi grandes, car, après hydrolyse, le phosphore lié aux riboses pyrimidiques ne se détache pas facilement. La quantité de phosphore contenue dans des ARN serait de 9% selon Webb, et de 9-9,5% selon Ceriotti.

Extraction des acides désoxyribonucléiques.

Nous avons fait deux extractions de 20 minutes par l'acide

perchlorique 0,5 N à 100°C. L'acide désoxyribonucléique a été dosé par la méthode à l'indole selon Ceriotti (110), et le phosphore a été dosé comme précédemment. Le mécanisme du dosage des acides désoxyribonucléiques à l'indole n'est pas encore connu. On sait que la réaction est due au sucre. L'indole donne une coloration avec l'ADN en présence de l'acide chlorhydrique à chaud. La couleur obtenue est extraite par le chloroforme (trois fois) et, après centrifugation, on lit l'absorption au spectrophotomètre à 490 mμ. Cette méthode est une modification de la méthode de Dische (111).

Dans les acides désoxyribonucléiques, le rapport purine/pyrimidine ne varie pas autant que dans le cas des acides ribonucléiques (112). Cependant, le pourcentage du phosphore dans les ADN est de 7,9 selon Webb et de 8 - 9,89 selon Ceriotti.

Résultats.

Dans le tableau 10 (p. 120) on voit que les résultats des dosages faits sur les extraits acidosolubles font ressortir une augmentation très importante du pourcentage d'azote dans les milieux contenant 200γ et 300γ d'aspergillomarasmine B/ml.

Le tableau 11 (p. 121) représente les rapports des pourcentages d'azote dans l'extrait acidosoluble, entre les milieux contenant différentes quantités de substance B et les milieux sans aspergillomarasmine B. Ce rapport est entre 1,7 - 1,8 quand on ajoute 200-300 γ de substance B/ml au milieu de culture, tandis qu'en présence de 100 γ de substance B/ml, le rapport varie entre 0,98 et 1,06. Il n'y a donc pas de différence entre les milieux sans aspergillomarasmine B et ceux contenant 100 γ de substance B/ml.

TABLEAU 10

Extraits acidosolubles.

Pourcentages d'azote et de phosphore dans les extraits acidosolubles de E. coli B cultivé dans des milieux de culture contenant 100-300γ d'aspergillomarasmine B/ml et sans substance B, rapporté au poids sec des bactéries (mg/100 mg bact. sec).

Exp. N°	Azote %	Phosphore %	Milieu	Temps d'incubation
I	1,3	0,29	s.B. n.b.	15 heures
I	1,28	0,27	100γ B/ml n.b.	15
II	1,8	0,29	s.B. b.	22
II	1,8	0,27	100γ B/ml b.	22
II	3,0	0,39	200γ B/ml b.	17
II	3,2	0,36	300γ B/ml b.	17
III	1,9	0,32	s.B. b.	17
III	2,0	0,34	100γ B/ml b.	17
III	3,2	0,40	200γ B/ml b.	17
III	3,4	0,37	300γ B/ml b.	17
IV	1,86	0,34	s.B. b.	17
IV	1,98	0,32	100γ B/ml b.	17
IV	3,3	0,415	200γ B/ml b.	17
IV	3,3	0,38	300γ B/ml b.	17

Abréviations : s.B. = sans aspergillomarasmine B
b. = barboté
n.b. = non barboté

TABLEAU 11

Rapports des pourcentages d'azote dans les extraits acido-solubles de E. coli B cultivé dans un milieu de culture contenant 100-300γ d'aspergillomarasmine B/ml et sans substance B.

N° d'exp.	% N 100γ B/ml / % N s.B.	% N 200α B/ml / % N s.B.	% N 300γ B/ml / % N s.B.
I	0,985	-	-
II	1,0	1,67	1,78
III	1,05	1,68	1,79
IV	1,065	1,77	1,77

Abréviations : B = aspergillomarasmine B
s.B. = sans aspergillomarasmine B

Les plus grandes différences ont été obtenues en incubant les bactéries pendant 17 heures.

Les résultats des dosages de l'acide ribonucléique après séparation selon Ogur et Rosen sont résumés dans le tableau 12 (p. 122). Les quantités de ribose total sont calculées selon Ceriotti (ribose dosé = 57,7% du ribose total. Ribose total = 38,4% des acides ribonucléiques). Selon les résultats il n'y a pas de variation des taux d'acides ribonucléiques en présence d'aspergillomarasmine B. Selon les résultats obtenus dans le tableau 13 (p. 123), il n'y a pas de différence significative entre les taux d'acide désoxyribonucléique des milieux sans, et de ceux avec aspergillomarasmine B. La quantité d'ADN était calculée d'après un témoin provenant du thymus. Nous avons groupé les résultats des dosages des acides nucléiques et les rapports ARN/ADN dans le tableau

TABLEAU 12

Résultats des dosages des acides ribonucléiques après extraction par l'acide perchlorique N à froid, de E. coli B cultivé dans des milieux de culture contenant 100 - 300 γ d'aspergillomarasmine B/ml.

Exp. N°	γ B / mg bact. extr.	γ ribose dosé / mg bact. extr.	γ ribose total calculé / mg bact. extr.	γ ARN calculé / mg bact. extr.	quantité de subst. B ajoutée au milieu
I	7,1	26,0	45	117	s.B.
I	7,0	24,0	41,5	108,5	100γ B/ml
II	7,0	24,3	42,1	101	s.B.
II	7,2	26,0	45,0	117	100γ B/ml
II	7,6	32,0	50,5	144	200γ B/ml
II	7,8	29,2	50,7	132	300γ B/ml
III	7,4	28,0	48,5	126	s.B.
III	7,6	29,0	50,3	131	100γ B/ml
III	8,6	32,0	55,5	144	200γ B/ml
III	8,0	30,0	52,0	135	300γ B/ml
IV	7,4	29,0	50,3	131	s.B.
IV	7,5	28,0	48,5	126	100γ B/ml
IV	8,5	32,0	55,5	144	200γ B/ml
IV	8,0	30,0	52,0	135	300γ B/ml

TABLEAU 13

Résultats des dosages des acides désoxyribonucléiques, après extraction par l'acide perchlorique 0,5 N à chaud de E. coli B cultivé dans des milieux de culture contenant 100 - 300 γ d'aspergillomarasmine B/ml.

Exp. N°	γ B / mg bact. extr.	γ ADN dosé / mg bact. extr.	quantité de subst. B ajoutée au milieu
I	4,0	36	s.B.
I	4,2	38	100γ B/ml
II	4,4	39,5	s.B.
II	4,6	42	100γ B/ml
II	4,4	40,27	200γ B/ml
II	4,7	45	300γ B/ml
III	4,4	40	s.B.
III	4,3	39,3	100γ B/ml
III	4,6	43	200γ B/ml
III	4,4	40	300γ B/ml
IV	4,2	38,7	s.B.
IV	4,4	39,3	100γ B/ml
IV	4,6	44	200γ B/ml
IV	4,4	40	300γ B/ml

14 (p. 124). En comparant ces résultats avec les données de la littérature, nous avons constaté un accord satisfaisant pour les quantités d'ADN et d'ARN trouvées, ainsi que pour leur rapport. Toutefois, il nous a été impossible de mettre en évidence une

TABLEAU 14

Exp. N°	% acides nucl. selon les sucres dosés	ARN / ADN selon les sucres	γP trouvé dans ac. nucl. / mg bact. extr.	γP calculé selon ac. nucléique / mg bact. extr.	γ substance B ajoutée / ml milieu
I	15,3	3,25	11,1	14,73	s.B.
I	14,65	2,86	11,2	13,03	100γ B/ml
II	14,05	2,55	11,4	13,71	s.B.
II	15,9	2,79	11,8	14,07	100γ B/ml
II	18,4	3,58	13,0	16,57	200γ B/ml
II	17,7	2,94	12,5	15,72	300γ B/ml
III	16,6	3,15	11,8	14,75	s.B.
III	17,03	3,34	11,9	15,14	100γ B/ml
III	18,7	3,35	13,2	16,61	200γ B/ml
III	17,0	3,38	12,4	15,55	300γ B/ml
IV	16,97	3,4	11,6	15,1	s.B.
IV	16,53	3,2	11,9	14,64	100γ B/ml
IV	18,8	3,28	13,1	16,69	200γ B/ml
IV	17,5	3,38	12,4	15,55	300γ B/ml

action sur le métabolisme des acides nucléiques de l'aspergillomarasmine B dans les conditions de nos expériences.

Discussion et résumé.

Nous avons étudié l'action de l'aspergillomarasmine B sur le métabolisme des acides nucléiques chez E. coli B, dans un milieu de culture contenant des sels, du glucose, mais pas d'acides aminés. Selon les résultats de dosage des acides nucléiques dans les extractions, il n'y a ni diminution, ni augmentation des taux d'acides nucléiques en présence de substance B. Nous avons obtenu des valeurs en acides nucléiques variant entre 15-18% en présence de substance B et entre 15-17% en son absence. Ces chiffres correspondent aux données de la littérature(113).

Les seules modifications que nous ayons pu mettre en évidence portent sur la partie acidosoluble. La présence de l'aspergillomarasmine B aux doses de 200γ et 300γ/ml dans des milieux de culture, augmente le taux d'azote/mg de bactérie (rapporté au poids sec).

On peut supposer que la substance B est incorporée dans les microorganismes et qu'elle est utilisée au cours du métabolisme de l'azote. Toutefois nos seules expériences ne permettent pas de trancher cette question complexe, et des travaux ultérieurs, par exemple à l'aide de l'aspergillomarasmine B marqué, permettront de vérifier le rôle de la substance B dans la biosynthèse des protéines dans les microorganismes.

o o o

CHAPITRE XIV

EFFET DE L'ASPERGILLOMARASMINE B SUR LA FORMATION DU GRANULOME EXPERIMENTAL, PROVOQUE PAR LA CARRAGEENINE CHEZ LES COBAYES

La carrageenine est une substance extraite de l'algue Chondrus crispus. C'est un polygalactose sulfaté, ayant l'aspect, après qu'elle ait été purifiée, de fibres grisâtres (114, 115, 116, 117).

L'injection souscutanée de 50 mg de cette substance provoque la formation d'un granulome sous la peau des cobayes, à l'endroit de l'injection (118). On peut facilement séparer ce granulome de la peau et du péritoine à partir du quatrième jour après l'injection.

Selon Williams, l'administration souscutanée de la carrageenine provoquerait une réaction polymorphonucléaire, suivie d'une réaction granulomateuse et du développement du tissu conjonctif néoformé, qui se transformerait en collagéné "adulte" vers le quinzième jour (119). On différencie les formes du collagène grâce à leur solubilité dans le chlorure de sodium (120), dans du citrate (121), etc.

Il existe une similitude de composition chimique entre le tissu conjonctif de la peau et le granulome (122). Le tissu conjonctif souscutané contient des protéines, comme le collagène, l'élastine et des protéines non collagéniques (selon Boas (123), celles-ci migrent, à l'électrophorèse sur papier, comme les protéines stériques). On trouve également des acides aminés et des

peptides (124), des polyosides acides et neutres comme le glycogène (polymère du glucose) et d'autres, qui contiennent, selon Consden (125), du galactose, du mannose et des acides uroniques.

Le granulome atteint son maximum de poids vers le septième jour, une teneur maximum en collagène le 21ème jour après l'injection (126).

Les travaux de Slack (127) ont montré, qu'après l'injection de carrageenine, il y a formation rapide de polysaccharides sulfatés qui précèdent la formation du collagène. Dans l'extrait du granulome par le chlorure de sodium 0,2 M on trouve, toujours selon le même auteur, un précurseur métabolique des polysaccharides sulfatés, ainsi que des quantités importantes de collagène "jeune" soluble dans les solutions salines neutres; il y aurait une relation métabolique étroite entre ce collagène et le précurseur.

On a réussi à provoquer de semblables granulomes avec des alginates et de l'agar (128). Certains auteurs ont étudié de manière approfondie l'action antiinflammatoire de certaines hormones, comme l'ACTH et la cortisone (129), tandis que d'autres travaux ont montré que certaines substances synthétiques renfermant des cycles éthylèneimine, donnaient de bons résultats en tant qu'agents antimitotiques à l'égard de certains tissus cancéreux (130, 131).

Nous avons étudié l'action de l'aspergillomarasmine B sur les granulomes provoqués par injection de la carrageenine aux cobayes.

Matériel et Méthodes.

Nous avons travaillé avec des cobayes dont le poids variait entre 200-300 g (excepté pour un lot où les poids atteignaient 750 g). La carrageenine provenait de la Seaplant Co. (Mass., USA). Nous avons préparé la solution à injecter de la façon suivante : 1 g de carrageenine a été dispersé dans un turmix dans 100 ml de chlorure de sodium 0, 9%; la suspension est ensuite chauffée à 90° au bain-marie. On répète ceci trois fois, on obtient alors une solution limpide et visqueuse. Cette solution a été gardée à l'étuve à 37°C avant l'utilisation et durant le temps de l'injection. Chaque injection, faite dans la partie abdominale basse des cobayes, était de 5 ml (contenant 50 mg de carrageenine).

La solution d'aspergillomarasmine B employée avait la même concentration que celle de la carrageenine (10 mg/ml). L'aspergillomarasmine B a été dissous dans le chlorure de sodium 0, 9%, à l'aide de quelques gouttes de soude afin d'obtenir une solution à pH 7.

Pour faire des injections souscutanées de carrageenine et d'aspergillomarasmine B, nous avons dissous ce dernier dans la solution de carrageenine.

Les animaux étaient sacrifiés le cinquième jour après l'injection, les granulomes, séparés par dissection, étaient pesés immédiatement après séparation, puis congelés.

Nous avons administré aux cobayes témoins la carrageenine seule, à un deuxième lot, la carrageenine et la substance B ensemble. Les animaux du troisième lot ont reçu la carrageenine, comme le lot témoin, dans 5 ml. Ensuite, nous leur avons injecté la substance B aux doses suivantes : 15 mg, le jour de

l'injection de la carrageenine; 15 mg, le deuxième jour et 20 mg, le quatrième jour après l'injection. De cette façon, la dose totale de l'aspergillomarasmine B est égale à la dose de carrageenine injectée. Ces injections de la substance B ont été pratiquées dans le dos, sous la peau de l'animal.

Résultats.

1. Cobayes témoins.

Nous avons injecté la carrageenine seule à 17 cobayes. La quantité de carrageenine injectée, en mg pour 100 g de poids d'animal, était en moyenne de 17.

La quantité de tissu néoformé, en g/100 g de poids d'animal, était en moyenne 1,2.

Nous avons trouvé le granulome entouré d'un exsudat abondant chez 13 d'entre les cobayes témoins, ce qui représente 76% des cas. Les autres animaux avaient peu ou pas d'exsudat visible à l'oeil nu.

2. Cobayes ayant reçu la carrageenine et l'asepergillomarasmine B ensemble.

Nous avons injecté à 28 cobayes la carrageenine et la substance B ensemble. La quantité de carrageenine et de substance B injectée, en mg par 100 g de poids d'animal, était en moyenne 17. La quantité de tissu néoformé, en g/100 g de poids d'animal, était en moyenne 0,5. Cela représente une diminution de 58,4% comparé à la production de tissu granulomateux par le groupe témoin. Nous avons trouvé le granulome entouré d'exsudat chez 5 cobayes seulement, ce qui représente 17 % des cas.

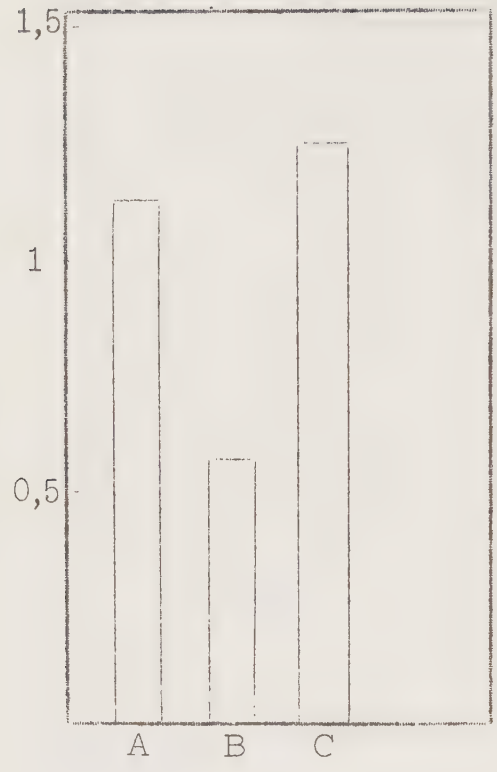


FIGURE 31

Histogramme.

Ordonnées : g de tissu formé en moyenne par 100 g de poids d'animal.

Abscisses :

A. carrageenine seule.
B. carrageenine avec aspergillomarasmine B ensemble.
C. carrageenine injecté dans le ventre et substance B dans le dos.

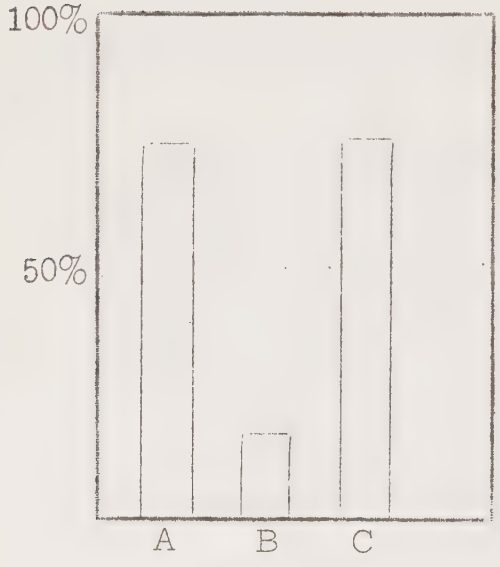


FIGURE 32

Histogramme.

Ordonnées : Pourcentage des animaux dans chaque lot où le granulome a été entouré par un exsudat.

Abscisses :

A. carrageenine seule.
B. carrageenine injecté avec l'aspergillomarasmine B ensemble.
C. carrageenine injecté dans le ventre et substance B dans le dos.

3. Cobayes ayant reçu la carrageenine dans le ventre et l'aspergillomarasmine B dans le dos.

Nous avons injecté à 22 cobayes, 15 mg de carrageenine en moyenne pour 100 g de poids. Ils ont reçu ensuite une quantité égale de substance B en 3 injections, comme nous l'avons décrit plus haut.

La quantité de tissu néoformé était de 1,2 g/100 g de poids d'animal et le granulome était entouré d'un exsudat dans 77% des cas.

Ces résultats sont résumés dans les figures 31 et 32 (ci-contre). L'aspergillomarasmine B manifeste donc une action inhibitrice sur la formation du tissu granulomateux lorsqu'il est injecté avec la carrageenine.

Calculs statistiques.

Nous voulions savoir si cet effet anti-inflammatoire de l'aspergillomarasmine B était significatif. Nous avons calculé la variance à l'aide des méthodes statistiques habituelles (132).

n = nombre d'animaux.

Lorsque $n_1 + n_2 - 2$ est supérieur à 30, la loi de distribution de t est approximativement la loi normale réduite. On teste alors directement la différence $m_1 - m_2$ (m = moyenne en g de tissu néoformé/100 g de poids d'animal), distribuée normalement autour de 0 avec la variance :

$$\sigma_e^2 = \frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}$$

Les deux moyennes seront significativement différentes si leur différence est supérieure à $\delta_1 \sigma_e$ ou δ et le coefficient de sécurité, σ_e = l'écart type.

Dans notre cas : $n_1 = 17$ (carrageenine seule); $n_2 = 28$ (carrageenine + substance B); $17 + 28 - 2 = 43$ et $43 > 30$, c'est-à-dire que la loi est applicable.

$m_1 = 1,2$ (carrageenine seule); $m_2 = 0,5$ (carrageenine + substance B ensemble)

On obtient le σ^2 de la façon suivante : $\sigma^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n - 1}$; Δ est la différence entre la moyenne de chaque groupe et les valeurs individuelles. Prenons l'exemple de 1. La moyenne $m_1 = 1,2$ et le tissu trouvé chez un cobaye était de 1,1 par 100 g de poids d'animal. $\Delta = 1,2 - 1,1 = 0,1$. On fait de même pour toutes les valeurs.

$\sigma_1^2 = 0,38$ (carrageenine seule) ; $\sigma_2^2 = 0,13$ (carrageenine avec substance B ensemble)

$$\sigma_e^2 = \frac{0,38}{17} + \frac{0,13}{28} = 0,026 \qquad \sigma_e = \sqrt{0,026} = 0,161$$

Comme nous l'avons dit plus haut, les deux moyennes seront significativement différentes si leur différence est supérieure à $\delta_1 \sigma_e$. La différence des deux moyennes : $m_1 - m_2 = 0,7$.

δ pour un coefficient de sécurité de 95% est : 1,96, et pour un coefficient de 99% est : 2,58 selon la table de t (seuils de signification de Lamotte)(132).

$$\delta_1 \sigma_e = 1,96 \times 0,161 = 0,316 \qquad 0,316 < 0,7$$

$$\text{et} \qquad 0,161 \times 2,58 = 0,415 \qquad 0,415 < 0,7$$

Les deux moyennes sont significativement différentes pour un degré de sécurité de 99%.

Discussion.

Nous avons injecté par voie souscutanée 67 cobayes, dont

17 avec la carrageenine seule, 28 avec le mélange carrageenine-aspergillomarasmine B et 22 avec la carrageenine dans le ventre et la substance B dans le dos. Les quantités d'aspergillomarasmine B injectées étaient égales aux quantités de carrageenine.

Les résultats présentés dans les figures 31 et 32 (p. 130) montrent que la substance B injectée avec la carrageenine diminue la formation des granulomes (58,4 % d'inhibition) et selon les calculs statistiques on peut en conclure que cette inhibition est hautement significative.

L'effet inhibiteur de l'aspergillomarasmine B est très net vis-à-vis de la formation de l'exsudat. Ceci peut être dû au fait que la substance B diminue la perméabilité capillaire, ou bien qu'il diminue la quantité de précurseurs hydrosolubles des protéines et polyosides synthétisés in situ ou apportés par le sang.

L'effet anti-inflammatoire de l'aspergillomarasmine B rappelle celui de la cortisone qui, elle aussi, diminue la masse du granulome provoqué par injection de la carrageenine (133, 134).

Nos expériences ont démontré que la substance B n'exerce pas son action anti-inflammatoire si on ne l'injecte pas au même endroit que la carrageenine.

Le mécanisme de l'action anti-inflammatoire de la substance B peut être recherché ou bien dans l'inhibition de la synthèse des protéines de type collagène, ou par l'inhibition de la synthèse des polyosides sulfatés qui est un phénomène plus précoce. Cette activité "anti-phlogistique" de l'aspergillomarasmine B peut s'expliquer par une action directe sur les cellules : il agirait comme agent cytostatique et anti-mitotique.

Résumé.

67 cobayes ont été injectés, dont 17 avec la carrageenine seule, 28 avec la carrageenine et l'aspergillomarasmine B ensemble et 22 avec la carrageenine dans le ventre et la substance B dans le dos.

L'aspergillomarasmine B a un effet anti-inflammatoire si on l'injecte en même temps que la carrageenine. La différence entre la masse du tissu néoformé avec ou sans aspergillomarasmine B est significative, avec un degré de sécurité de 99%. La substance B inhibe la formation d'un exsudat autour des granulomes dans 83% des cas. L'aspergillomarasmine B, injecté séparément de la carrageenine, n'a aucun effet anti-inflammatoire et n'empêche pas la formation de l'exsudat.

° ° °

RESUME

Nous avons entrepris l'étude chimique et biologique de trois substances, isolées du milieu de culture de Aspergillus flavus oryzae (ordre des Ascomycètes).

Deux de ces trois substances sont des phytotoxines. Nous les appelons aspergillomarasmines A et B. La troisième substance est inactive. Elle se forme à partir de l'aspergillomarasmine B, par lactamisation. Nous l'appelons anhydro-aspergillomarasmine B.

I RESULTATS DES ETUDES CHIMIQUES

Les trois substances se présentent sous forme de poudres blanches, cristallines. Elles sont actives vis-à-vis de la lumière polarisée. L'aspergillomarasmine B étant en plus grande quantité dans le milieu de culture, a fait l'objet principal de cette étude.

1. Aspergillomarasmine A.

Les résultats des analyses élémentaires permettent d'envisager deux possibilités pour la formule brute : $C_9H_{15}O_7N_3$ ou $C_{10}H_{17}O_8N_3$. L'aspergillomarasmine A fond avec décomposition entre 225° et 236°. Son pouvoir rotatoire, mesuré dans un tampon phosphate à pH 7, est: $[\alpha]_D^{20°} = -48°$. La méthode de Van Slyke indique deux fonctions aminées libres sur trois, cependant la méthode de Sörensen met en évidence une seule valence aminée libre. Selon les résultats des titrages complexométriques, 1 micromole

de métal est chélatée par 310 µg d'aspergillomarasmine A.

La substance A réagit à la ninhydrine, en donnant une coloration pourpre à froid. L'hydrolyse chlorhydrique libère deux substances révélables à la ninhydrine : l'acide aspartique et un autre produit, qui ne semble pas être identique à un acide aminé connu. Ce dernier a été isolé par chromatographie préparative sur papier. La substance obtenue est incristallisable et très hygroscopique. Lors d'une électrophorèse à haut voltage sur papier, cette substance s'est révélée très acide, par conséquent nous proposons de l'appeler "acide A". Les résultats des essais effectués avec l'aspergillomarasmine A ne nous permettent pas de proposer de formule développée.

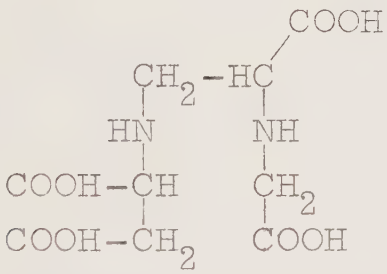
2. Aspergillomarasmine B.

Les résultats des analyses élémentaires conduisent à la formule brute : $C_9H_{14}O_8N_2$ pour l'aspergillomarasmine B. Le produit fond, avec décomposition, entre 221° et 231°. Le pouvoir rotatoire de cette substance, mesuré dans un tampon phosphate à pH 7, est : $[\alpha]_D^{20°} = -20°$. On ne trouve pas d'azote aminé libre par la méthode de Van Slyke. Selon les résultats des titrages complexométriques, l'activité complexante de cette substance est comparable à celle de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

L'aspergillomarasmine B réagit à la ninhydrine à chaud, en donnant une coloration pourpre. Elle se transforme, en milieu acide, à froid ou par chauffage dans l'eau, en anhydro-aspergillomarasmine B. Cette transformation en milieu alcalin, même à l'ébullition, est partielle.

L'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B conduit à

l'anhydro-aspergillomarasmine B, à l'acide aspartique et au glycocolle. Les deux acides aminés sont libérés en même temps, en quantité équimoléculaire. L'acide aspartique isolé de l'aspergillomarasmine B est l'acide L-aspartique. L'analyse élémentaire de l'ester méthylique préparé par action du diazométhane sur l'aspergillomarasmine B, correspond à la formule brute $C_{13}H_{22}O_8N_2$. Le dosage de méthoxyle effectué sur ce même ester indique quatre fonctions carboxyliques dans la molécule. D'après les résultats obtenus par spectrographie de masse, le Professeur K. Biemann a proposé comme hypothèse de travail pour la substance B la structure suivante :



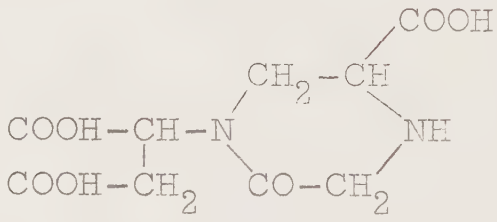
L'ensemble des propriétés physiques et chimiques d'une part, les propriétés biologiques d'autre part, nous ont amené à envisager l'identité de l'aspergillomarasmine B avec l'acide lycomarasmique préparé par Liechti et Hardegger à partir de la lycomarasmine. Cette identité a été ensuite prouvée par la comparaison directe des spectres I.R. et des R_F.

3. Anhydro-aspergillomarasmine B.

Les résultats des analyses élémentaires correspondent à la formule brute $C_9H_{12}O_7N_2$. le produit fond avec décomposition entre 270° et 292°. Son pouvoir rotatoire, mesuré dans un tampon phosphate à pH 7, est : $[\alpha]_D^{20°} = -103°$. On ne trouve pas d'azote

aminé libre par la méthode de Van Slyke. L'anhydro-aspergillomarasmine B réagit à la ninhydrine, en donnant une coloration jaune à froid. L'hydrolyse acide libère des quantités équimoléculaires d'acide aspartique et de glycocolle.

L'analyse élémentaire de l'ester méthylique de cette substance correspond à une formule brute : $C_{12}H_{18}O_7N_2$. Le dosage de méthoxyle effectué sur ce même ester indique trois fonctions carboxyliques, et son spectre U.V. montre une absorption à 190 mμ (ε = 10 000 dans l'hexane), caractéristique d'une fonction amide. D'après les résultats obtenus par spectrographie de masse, le professeur Biemann propose la structure suivante pour cette substance :



Nous avons pu constater que l'anhydro-aspergillomarasmine B était identique à la "substance J" isolée par Plattner et Clauson-Kaas du milieu de culture de Fusarium lycopersici (Sacc.). Les spectres I.R. et les R_F des deux substances sont identiques.

II RESULTATS DES ETUDES BIOLOGIQUES

Les aspergillomarasmines A et B provoquent le flétrissement de feuilles de tomates. L'aspergillomarasmine B possède une activité aussi puissante que l'acide lycomarasmique. L'anhydro-aspergillomarasmine B est inactif, de même que la substance J de Plattner. Malgré une activité comparable de l'aspergillo-

marasmine A et de la lycomarasmine, les études chimiques ont permis de conclure à la non-identité de ces deux substances.

Nous avons entrepris l'étude du pouvoir antioxydant de l'aspergillomarasmine B, en le comparant à l'EDTA. Nous avons montré que la substance B inhibe l'oxydation catalysée par le Cu^{++} de l'acide ascorbique et des fonctions thiols de la cystéine, de la caséine et de la sérumalbumine. La vitesse de dissociation du complexe substance B-Cu^{++} semble être supérieure à celle du complexe EDTA-Cu^{++}.

L'aspergillomarasmine B inhibe la formation des peroxydes lipidiques dans des homogénats hépatiques. Nous avons provoqué la formation des peroxydes sous l'influence des rayons U. V. d'une part, et par incubation avec l'acide ascorbique d'autre part. L'EDTA, étudié par comparaison, se comporte à peu de chose près de la même manière.

En étudiant l'action inhibitrice de l'aspergillomarasmine B sur les activités peroxydasiques de l'hémoglobine et du complexe hémoglobine-haptoglobine, nous avons constaté que l'importance de l'inhibition dépendait de la nature de l'accepteur utilisé. L'inhibition la plus forte a été obtenue en présence d'acide ascorbique utilisé comme accepteur.

Nous avons étudié ensuite l'influence de l'aspergillomarasmine B sur le métabolisme des acides nucléiques chez Escherichia coli B et trouvé que la présence de cette substance aux doses de 200 et 300 γ/ml dans des milieux de culture, augmente le taux d'azote/mg de bactéries.

Nous avons injecté 67 cobayes avec de la carrageenine, pour provoquer la formation d'un granulome. L'aspergillomarasmine B a un effet anti-inflammatoire si on l'injecte avec la carra-

geenine. La différence entre la masse du tissu néoformé, en présence ou en absence d'aspergillomarasmine B, est significative avec un degré de sécurité de 99%. La substance B inhibe la formation d'un exsudat autour du granulome dans 83 % des cas.

° ° °

BIBLIOGRAPHIE

1 K.BIEMANN, J.SEIBL, F.GAPP. Biochem.Biophys.Res. Comm., 1959, 1, 307.

2 N.CLAUSON-KAAS, Pl.A.PLATTNER, E.GÄUMANN. Ber.Schweiz.Bot.Ges., 1944, 54, 523.

3 Pl.A.PLATTNER, N.CLAUSON-KAAS. Experientia, 1945, 1, 195.

4 P.LIECHTI. Thèse de l'Ecole Polytechnique de Zurich (1958).

5 E.GÄUMANN, O.JAAG. Experientia, 1946, 2, 215.

6 N.H.CROMWELL, R.A.WANKEL. J.Am.Chem.Soc., 1949, 71, 711.

7 M.A.STOLBERG, J.J.O'NEILL, T.WAGNER-JAUREGG. J.Am.Chem.Soc., 1953, 75, 5045.

8 D.W.TURNER. J.Chem.Soc., 1957, 4555.

9 E.LEDERER et coll. Chromatographie en chimie organique et biologique. Vol.I, Ed.Masson, Paris 1959.

10 R.J.BLOCK, E.L.DURRUM, G.ZWEIG. A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. 1955, Acad.Press Inc.Publ., New York.

11 H.K.BERRY, L.CAIN. Arch.Biochem.Biophys., 1949, 24, 179.

12 L.HORNER, W.KIRMSE. Liebigs Ann., 1953, 597, 48.

13 L.RUTTER. Nature, 1948, 161, 435.

14 B.LINDQVIST, T.STORGARDS. Acta Chem.Scand., 1953, 7, 87.

15 A.KUNTZEL, Th.DROSCHER. Biochem.Z., 1940, 306, 177.

16 G.N.COPLEY. Analyst, 1941, 66, 492.

17 K.J.MORGAN, J.BARDWELL, C.F.CULLIS. J.Chem.Soc., 1950, 3190.

18 S.MOORE, D.H.SPACKMAN, W.H.STEIN. Anal.Chem., 1958, 30, 1185.

19 D.H.SPACKMAN, W.H.STEIN, S.MOORE. Anal.Chem., 1958, 30, 1190.

20 P.BOURDET, E.CHERBULLIEZ. Helv.Chim.Acta, 1955, 38, 841.

21 A.BOLLER. Thèse de l'Ecole Polytechnique de Zurich, 1951.

22 H.BICKEL, H.SCHMIDT, P.KARRER. Helv.Chim.Acta, 1955, 38, 649.

23 R.ENTCHEL, C.H.EUGSTER, P.KARRER. Helv.Chim.Acta, 1956, 39, 1263.

24 L.ZERVAS, M.WIRITZ, J.P.GREENSTEIN. J.Org.Chem., 1957, 22, 1515.

25 G.HILLMANN. Naturforsch., 1946, 1, 682.

26 E.ABDERHALDEN, S.SUZUKI. Z.Physiol.Chem., 1928, 176, 101.

27 J.C.SHEEHAN, G.P.HESS. J.Am.Chem.Soc., 1955, 77, 1067.

28 H.G.KHORANA. Can.J.Chem., 1953, 31, 588.

29 W.WEITH. Berichte, 1874, 7, 10.

30 H.G.KHORANA. Chem.and Ind., 1955, 1087.

31 M.BUZAS, Ch.EGNELL, P.FREON. C.R.Ac.Sc., 1961, 252, 896.

32 H.K.MILLER, H.WAELSCH. J.Am.Chem.Soc., 1952, 74, 1092.

33 B.F.ERLANGER, R.M.HALL. J.Am.Chem.Soc., 1954, 76, 5781.

34 G.FAUST, M.KLEPPEL. J.Pract.Chem., 1960, 11, 133.

35 Pl.A.PLATTNER, N.CLAUSON-KAAS, A.BOLLER, U.NAGER. Helv.Chim.Acta, 1948, 31, 860.

36 H.W.WOLLENWEBER, O.A.REINKING. Die Fusarien, Berlin, 1935.

37 D.GOTTLIEB. Phytopathol., 1943, 33, 126.

38 E.GÄUMANN, O.JAAG. Ber.Schweiz.Bot.Ges., 1947, 57, 7.

39 E.GÄUMANN, S.NAEF-ROTH, G.MIESCHER. Phytopath.Z., 1950, 16, 289.

40 D.W.WOOLEY. J.Biol.Chem., 1948, 176, 1299.

41 E.GÄUMANN. Die Pilze. Birkhäuser Verlag, Bâle 1949.

42 A.von SZENT GYÖRGYI. J.Biol.Chem., 1931, 90, 385.

43 H.KERSTEIN, W.KERSTEIN, Hj.STAUDINGER. Biochem.Z., 1955, 327, 284.

44 H.KERSTEIN, W.KERSTEIN, Hj.STAUDINGER. Biochim.Biophys.Acta, 1955, 18, 312. 1958, 29, 350.

45 H.SCHMIDT, Hj.STAUDINGER. Biochem.Z., 1954, 325, 288.

46 M.KERN, E.RACKER. Arch.Biochem.Piophys., 1954, 48, 235.

47 E.MARRE, O.ARRIGONI. Biochim.Biophys.Acta, 1958, 30, 453.

48 V.du VIGNEAUD. Harvey Lectures, 1942-1943, 38, 39.

49 V.du VIGNEAUD. A Trail of Research (Cornell Univ.Press, Ithaca, N.Y., 1952).

50 E.S.G.BARRON. Adv.in Enzymology, 1951, 11, 201.

51 M.MACHEBOEUF, B.ROBERT. Bull.Soc.Chim.Biol., 1953, 39, 399.

52 B.ROBERT. Thèse de Sciences, Paris 1952.

53 L.MICHAELIS, M.P.SCHUBERT. J.Am.Chem.Soc., 1930, 52, 4418.

54 M.P.SCHUBERT. J.Am.Chem.Soc., 1931, 53, 3851.

55 M.P.SCHUBERT. J.Am.Chem.Soc., 1932, 54, 4077.

56 M.P.SCHUBERT. J.Am.Chem.Soc., 1933, 55, 4563.

57 B.ROBERT. Bull.Soc.Chim.Biol., 1954, 36, 253.

58 R.FLITMAN, E.FRIEDEN. J.Am.Chem.Soc., 1957, 79, 5198.

59 L.ROBERT, E.NEIADAS, G.CHARRANSOL. C.R.Ac.Sc., 1958, 246, 2543.

60 R.BRDICKA. Coll.Czechoslov.Chem.Comm., 1933, 5, 238.

61 M.BREZINA, P.ZMMAN. Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie. Akad.Verlag, Leipzig, 1956.

62 E.RACKER. Biochim.Biophys.Acta, 1952, 9, 577.

63 B.ROBERT, L.ROBERT. Ann.Biol.Clin., 1956, 14, 587.

64 L.ROBERT, B.ROBERT. 4e Coll.de l'Hôp.St.Jean de Bruge, 1956, p.124 (Ed.Tempel.).

65 M.KLOTZ. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 1949,14,97.

66 I.M.KOLTHOFF, B.P.WILLEFORD Jr. J.Am.Chem.Soc., 1958,80,5673.

67 H.F.DEUTSCH, B.E.KLINE, H.P.RUSCH. J.Biol.Chem., 1941,141,529.

68 K.A.C.ELLIOTT, B.LIBET. J.Biol.Chem., 1944,152,617.

69 F.P.SIMON, M.K.HORWITT, R.W.GERARD. J.Biol.Chem., 1944,154,421.

70 A.L.TAPPEL. J.Biol.Chem., 1955,217,721.

71 A.L.TAPPEL. Arch.Biochem.Biophys., 1953,44,378.

72 A.L.TAPPEL. Arch.Biochem.Biophys., 1954,50,473.

73 A.OTTOLENGHI, F.BERNHEIM, K.M.WILBUR. Arch.Biochem.Biophys., 1955,56,157.

74 A.BARBER, A.OTTOLENGHI. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1957,96,471.

75 A.OTTOLENGHI. Arch.Biochem.Biophys., 1959,79,355.

76 K.M.WILBUR, F.BERNHEIM, O.W.SHAPIRO. Arch.Biochem.Biophys., 1949,24,305.

77 H.I.KOHN, M.LIVERSEDGE. J.Pharmacol.and Exper. Therap., 1944,82,292.

78 J.M.LANDUCCI, J.POURADIER, M.DURANTE. Communication n°1706 des Laboratoires de Recherches Kodak-Pathé.

79 A.W.DOX, G.P.PLAISANCE. J.Am.Chem.Soc., 1916,31,2164.

80 G.P.PLAISANCE. J.Biol.Chem., 1917,29,207.

81 F.D.GUNSTONE, T.P.HILDITCH. J.Chem.Soc., 1945,836.

82 W.O.LUNDBERG, J.R.CHIPAULT. J.Am.Chem.Soc., 1947,69,833.

83 G.STEIN. J.Chim.Phys., 1955,52,634.

84 S.SCHONBEIN. J.Pract.Chem., 1858,75,78.

85 R.WILLSTÄTTER, H.WEBER. Liebigs Ann., 1926,449,156.

86 M.F.JAYLE. Bull.Soc.Chim.Fr., 1939,21,14.

87 M.POLONOVSKI, M.F.JAYLE, G.GLOTZ. Bull.Soc.Chim.Biol., 1939, 21, 48.

88 M.POLONOVSKI, M.F.JAYLE. Bull.Soc.Chim.Biol., 1939, 21, 66.

89 M.POLONOVSKI, M.F.JAYLE. C.R.Ac.Sc., 1940, 211, 517.

90 M.F.JAYLE. C.R.Ac.Sc., 1940, 211, 574.

91 L.ROBERT, J.SERPICELLI. "Protides of the biological fluids", Proc. of the 7th Coll. Bruges, 1959, 154.

92 L.ROBERT, V.BAJIC, M.F.JAYLE. C.R.Ac.Sc., 1956, 42, 2868.

93 M.NYMAN. Scand.J.Lab.Invest., SupplN°39, 1959, 11.

94 M.F.JAYLE. Bull.Soc.Chim.Biol., 1951, 33, 876.

95 D.KEILIN, T.MANN. Proc.Roy.Soc.London, 1937, 122, 110.

96 B.CHANCE. Arch.Biochem.Biophys., 1949, 22, 224.

97 B.CHANCE. Science, 1949, 109, 204.

98 P.N.SALZMAN, H.EAGLE, E.D.SEBRING. J.Biol.Chem., 1958, 230, 1001.

99 B.LEVENBERG, S.C.HARTMAN, J.M.BUCHANAN. J.Biol.Chem., 1956, 220, 379.

100 J.C.SONNE, I.LINN, J.M.BUCHANAN. J.Biol.Chem., 1956, 220, 369.

101 D.ELWYN, D.B.SPRINSON. J.Biol.Chem., 1954, 207, 4667.

102 H.L.LOCHTE, Jr. J.Lab.and Clin.Med., 1960, 55, 435.

103 D.KANAZIR. Thèse de Doctorat ès Sciences, 1955, Bruxelles.

104 E.VOLKIN, W.E.COHN. Methods of Biochemical Analysis, Vol.I, p.287. Interscience Publ.Inc., New York-London, 1954.

105 M.MACHEBOEUF, J.Z.DELARB. Bull.Soc.Chim.Biol., 1943, 25, 262.

106 M.OGUR, G.ROZEN. Arch.Biochem.Biophys., 1950, 25, 262.

107 G.CERIOTTI. J.Biol.Chem., 1955, 214, 59.

108 S.E.KERR, S.SEROIDARIAN, M.WARGON. J.Biol.Chem., 1949, 181, 761.

109 J.M.WEBB. J.Biol.Chem., 1956,221,635.

110 G.CERIOTTI. J.Biol.Chem., 1952,198,297.

111 L.DISCHE. Biochem.Z., 1929,204,431.

112 E.CHARGAFF. Experiantia, 1950,6,201.

113 J.N.DAVIDSON. The Biochemistry of Nucleic Acids. Methen et Co., London, 1950.

114 D.B.SMITH, W.H.COOK. Biochim.Biophys.Acta, 1953,45,232.

115 A.N.O'NEILL. J.Am.Chem.Soc., 1955,77,6324.

116 D.B.SMITH, W.H.COOK, A.S.PERLIN. Can.J.Chem., 1955,33,1352.

117 S.T.BAYLEY. Biochim.Biophys.Acta, 1955,17,194.

118 W.B.ROBERTSON, B.SCHWARTZ. J.Biol.Chem., 1953,201,689.

119 G.WILLIAMS. J.Path.Bact., 1957,73,557.

120 D.J.JACKSON. Biochem.J., 1957,65,277.

121 V.N.OREKHOVITCH, V.N.SHPIKITER. SCIOMS Conn. T.issue, Blackwell, Oxford, Masson, Paris 1957, p.281.

122 B.ROBERT. Thèse de Médecine, Paris 1959.

123 N.F.BOAS. Arch.Biochem.Biophys., 1955,57,367.

124 V.MENKIN. Am.J.Physiol., 1940,129,691.

125 R.CONSDEN. "Nature and Structure of Collagenes" (J.T. Randall, London, Butterworth Publ., 1953,p.196).

126 J.DUMPHY, K.M.UDUPA. New Eng.J.Med., 1957,253,487.

127 H.G.B.SLACK. Biochem.J., 1957,65,459.

128 G.G.TEDESCHI, M.T.MANGIANTINI. Arch.Sci.Biol., 1956,40,504.

129 A.HANSEN. Physiol.Rev., 1958,38,446.

130 A.RAVINA, M.PESTEL. La Presse Médicale, 1958,66,1111.

131 A.L.WALPOLE, P.C.ROBERTS, F.L.ROSE, J.A.HENDRY, R.F.HOMER. Brit.J.Pharmacol., 1954,9,306.

132 M. LAMOTTE. "Introduction à la biologie quantitative", Masson et Cie., 1948, p. 271.

133 B. J. CLAUSON, S. T. NERENBERG. J. Lab. Clin. Med., 1953, 42, 746.

134 M. B. LURIE, P. ZAPPASODI. Arch. Path., 1942, 34, 151.

° ° °

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

ANTIBIOTIQUES ANTITUMORAUX

Vu et approuvé :
Paris, le 16 Février 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences
Marc ZAMANSKY

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de PARIS,
Jean ROCHE